

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département d'écologie et environnement

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Filière : Ecologie et Environnement

Spécialité : Biodiversité et environnement

**Etude de la microbiologie des sols contaminées
par les hydrocarbures cas de la station-service de
fréha.**

Présenté par : **M. BAIKECHE Ahmed.**

M. BOUDJEMAI Amayas.

Soutenu le 13.07.2023, devant le jury composé de :

Mme	SADOUDI ALI AHMED	Prof.	Présidente
Mme	CHIBANE GH.	MAA	Promotrice
M	BOUACEME KH.	MCA	Co-promoteure
Mme	ALI AHMED S.	MCB	Examinatrice
Mme	DERMECHE S.	MCB	Examinatrice

Année universitaire 2022-2023

Remerciements

Tout d'abord nous rendons grâce à Dieu, lui qui nous a permis d'être bien portant afin d'effectuer ce travail du début jusqu'à la fin. Nous remercions nos parents respectifs pour leurs soutiens durant notre parcours de formation.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et notre profonde gratitude à notre promotrice Mme CHIBANE G. et

Co-promoteur Mr BOUACEME KH. Qui nous ont guidés avec leurs orientations, leurs conseils et leurs critiques tout au long de ce travail de recherche en nous laissant la liberté dont on avait besoins. On ne peut que leur être reconnaissant surtout pour leurs qualités intellectuelles et humaines. Nous remercions également tout le personnel de laboratoire de MICROBIOLOGIE et d'écologie en particulier Mme HAMDAD. Nos remerciements vont aussi aux membres du jury, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer ce travail et de participer à la soutenance. Et enfin, nous sommes reconnaissants envers tous les enseignants de la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques (FSBSA) qui ont contribué à notre formation, et également à nos camarades, amis pour leurs aides précieuses.

Dédicaces

Un moral d'acier et une volonté de fer décrivent bien mon parcours jusqu'ici. C'est dire combien il m'a été difficile de patienter toute une décennie pour prétendre à ce Master. Dieu

merci, j'ai été bien entouré et je tiens à dédier ce mémoire :

A mes très chers parents (Essaid, Louiza) sources de tendresse et de force Je vous remercie

d'être toujours à mes côtés, de me soutenir, de m'aimer et de me protéger.

A mes frères (Ramdhane, Islam)

A tous les membres de ma famille en particulier mes tantes

A mon binôme

A mes amis

Amyas

Dédicaces

Un moral d'acier et une volonté de fer décrivent bien mon parcours jusqu'ici. C'est dire combien il m'a été difficile de patienter toute une décennie pour prétendre à ce Master. Dieu

merci, j'ai été bien entouré et je tiens à dédier ce mémoire :

A mes très chers parents (Mohammed ou chabane & Hammama) sources de tendresse et de force Je vous remercie d'être toujours à mes côtés, de me soutenir, de m'aimer et de me

protéger.

A mes deux chers sœurs et frères (Katia, Tasaadite, et Rayan)

A tout les membres de ma famille en particulier mes tantes

A mon binôme

A mes amis

Mouh.B, Yacine.B, Toufik. A, Azwaw.C, Mouh.C, Elhadi A ...

Ahmed

Liste d'abréviations

St : Strate

MH : Mueller-Hinton

PCA : Plate Count Agar

VF : Viande-foie

VP : Voges Proskauer

RM : Rouge de Méthyl

VPI : Napht-1-ol en solution éthanol

VPII : Hydroxyde de potassium ou de sodium

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

COV : Composés organiques volatils

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse Bibliographique

I. Sol	3
I.1 Généralités sur le sol	3
I.1.1 Définition du sol	3
I.1.2 Formation d'un sol	3
I.2 Composants du sol	4
I.2.1 Fraction liquide	4
I.2.2 Fraction gazeuse	4
I.2.3 Fraction solide	4
I.3 Propriétés physiques du sol	5
I.3.1 Texture	5
I.3.2 Structure	5
I.3.3 Porosité	5
I.3.4 Régime hydrique du sol	5
I.3.5 Perméabilité du sol	6
I.3.6 Température	6
I.4 Propriétés chimiques	6
I.4.1 Potentiel d'hydrogène	6
I.4.2 Capacité d'échange cationique	6
I.4.3 Pouvoir tampon	6
I.4.4 Conductivité électrique	7
I.4.5 Calcaire total	7
II Hydrocarbures dans le sol	8

II.1	Définition	8
II.2	Classification des hydrocarbures	8
II.2.1	Hydrocarbures saturés.....	9
II.2.2	Hydrocarbures aromatiques polycycliques	9
II.2.3	Composés polaires	10
II.2.4	Résines et asphaltènes.....	10
II.3	Sources des hydrocarbures.....	10
II.3.1	Sources naturelles	10
II.3.2	Source anthropiques.....	10
II.4	Cas de station-service	11
II.5	Devenir des hydrocarbures dans l'environnement.....	11
II.5.1	Transformations abiotiques.....	11
II.5.2	Transformation biotique.....	12
II.6	Effets des hydrocarbures sur l'environnement	13
II.6.1	Effets sur le Sol.....	13
II.6.2	Effets sur la végétation et la faune.....	14
II.6.3	Effets sur les eaux	15
II.6.4	Effets sur la santé humaine	15
III	Microbiologie des sols.....	16
III.1	Répartition des microorganismes dans le sol	16
III.2	Biodégradation des hydrocarbures	16
III.3	Bactéries	16
III.3.1	Définition des bactéries	17
III.3.2	Bactéries dans le sol	17

Matériel et Méthodes

I. Présentation générale de la station-service de Fréha.....	18
I.1 Présentation de la commune de Fréha	18
I.2 Description de l'environnement immédiat de la station	19
I.3 Sol.....	20
II. Méthodes.....	20
II.1 Echantillonnage du sol.....	20
II.1.1 Préparation du sol	20
II.2 Analyse physico-chimiques du sol.....	21
II.2.1 Mesure du pH du sol	21
II.2.2 Mesure de l'humidité du sol	21
II.3 Analyse microbiologique du sol	21
II.3.1 Ensemencement par la méthode de suspension- dilution	21
II.3.1.1 Préparation de l'eau physiologique.....	21
II.3.1.2 Préparation de la solution mère	22
II.3.1.3 Préparation des suspensions dilutions	22
II.3.1.4 Préparation du milieu PCA.....	22
II.3.1.5 L'ensemencement Sur un milieu solidifié en boîte de Petri	22
II.3.2 Dénombrement des colonies bactériennes	24
II.3.3 Isolement et purification des bactéries par épuisement sur trois secteurs ou quadrants ...	24
II.4 Caractérisation des souches bactériennes	25
II.4.1 Etude morphologique.....	25
II.4.1.1 Etude macroscopique.....	25
II.4.1.2 Etude microscopique	25
II.4.1.2.1 Observation à l'état frais.....	25
II.4.1.3.2 Coloration de Gram	25
II.4.2 Etude biochimique par les tests classiques	26

II.4.2.1 Catalase.....	26
II.4.2.2 Nitrate réductase	27
II.4.2.3 Métabolisme glucidique (Test VP et RM).....	27
II.4.2.4 Citrate perméase	28
II.4.2.5 Etude du type respiratoire.....	28

Résultats et discussions

I. Résultats et discussions.....	29
I.1. Tests physico-chimiques.....	29
I.1.1. pH du sol.....	29
I.1.2. Humidité du sol.....	30
I.2. Résultats de tests microbiologique	31
I.2.1. Dénombrement des colonies sur boîte de Pétri.....	31
I.2.2. Isolement, purification et caractérisation macroscopique des souches bactériennes.....	32
I.2.3. Caractérisation microscopiques des souches bactériennes isolées	35
I.2.4. Tests biochimique	38
Conclusion et perspectives	40
Références bibliographiques.....	42

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Formation du sol	3
Figure 2 : Proportion des principaux composants du sol, et Données de la matière organique .	4
Figure 3 : Classification des hydrocarbures en fonction de leur structure	8
Figure 4 : Devenir d'un polluant dans le sol	13
Figure 5 : Situation géographique de la région de Fréha (Google maps, 2023))	19
Figure 6 : Vue globale du site d'étude avec la description de l'entourage (Live Earth Map 2023).....	19
Figure 7 : Ensemencement d'un milieu gélosé en surface après étalement	22
Figure 8 : Schéma récapitulatif des protocoles suivis pour l'isolement des bactéries.	23
Figure 9 : Ensemencement sur trois quadrants.....	24
Figure 10 : Variation du pH dans les trois strates	29
Figure 11 : Taux d'humidité des trois strates	30
Figure 12 : Observation d'état Faris sous microscope	38
Figure 13 : Coloration de Gram	38

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison en terme de populations microbiennes (UFC /g de sol) entre deux Sols différents, l'un rhizosphérique et l'autre non rhizosphérique	16
Tableau 2 : Dénombrement des colonies sur boîte de Petri.....	31
Tableau 3 : Caractérisation macroscopique des souches bactériennes isolée.....	33
Tableau 4 : Caractérisation microscopique des souches bactériennes isolées	35
Tableau 5 : Tests biochimiques.....	39

Introduction

La consommation mondiale en énergie ne cesse d'augmenter, les énergies fossiles étant, aujourd'hui les plus utilisées dans le monde (plus de 75%). Les pays asiatiques non membres de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), à leur tête la Chine, comptent pour plus de la moitié de cette augmentation. L'Algérie se positionne comme le dix-septième plus grand producteur de pétrole au monde, et l'un des trois principaux en Afrique (U.S. Energy information administration, 2019).

L'extraction et l'utilisation croissante du pétrole en tant que principale source d'énergie ont conduit à une augmentation significative des risques de contamination environnementale et sanitaire. Tout incident survenant lors du transport, de la production ou de l'utilisation des hydrocarbures peut entraîner des contaminations qui perturbent l'équilibre écologique et peuvent même entraîner la destruction d'un écosystème entier (Rouidi, 2014). La libération non contrôlée de composés pétroliers qui sont mutagènes, cancérigènes et potentiellement immunotoxiques dans le sol et l'eau représente une menace pour la santé humaine, animale et végétale (Singh et Lin, 2008).

La dépollution des sols contaminés se fait par de nombreuses méthodes en fonction de la toxicité du polluant et du risque qu'il représente. De nouvelles technologies sont en développement. Les techniques de traitement thermiques et physico-chimiques sont les plus répandues mais elles ont leurs limites du fait de leurs coûts ou de leurs impacts secondaires sur l'environnement (Abbia et Guitoun., 2013). La bioremédiation, une approche basée sur les processus biologiques, actuellement en plein essor et fait l'objet de nombreuses recherches à travers le monde. Elle utilise les capacités des microorganismes à dégrader et/ou détoxifier les polluants organiques, est reconnue comme un traitement efficace, économique et respectueux de l'environnement (Singh et Lin, 2008).

Les hydrocarbures pétroliers peuvent être dégradés par divers microorganismes tels que les bactéries, les champignons et les levures (Hamzah et *al.*, 2010). Les bactéries sont les agents les plus actifs dans la dégradation du pétrole (Rahman et *al.*, 2003). Car ils contiennent différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des hydrocarbures pétroliers (Al-Deeb et Malkawi, 2009 ; Hesham et *al.*, 2014).

Introduction

Notre étude a pour objectif de mesurer certains paramètres physico-chimiques dans les sols contaminés par les hydrocarbures dans la station-service de Fréha. De plus, nous cherchions à isoler et à identifier les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures présents dans ces sols. Pour ce faire, nous avons utilisé des méthodes d'observation des caractéristiques de ces souches bactériennes ainsi que des tests biochimiques.

Ce travail s'articule autour de trois chapitres :

- Le premier chapitre aborde une synthèse bibliographique sur le sol et sa pollution par les hydrocarbures et le rôle que jouent les microorganismes (les bactéries) dans leur élimination.
- Le deuxième chapitre représente l'étude expérimentale et les méthodes analytiques utilisées pour l'isolement et l'identification des souches bactériennes.
- Le troisième chapitre est dédié à la synthèse des résultats obtenus, et leur discutés.
- Le document sera clos par une conclusion et quelques perspectives.

I. Sol

I.1 Généralités sur le sol

I.1.1 Définition du sol

Selon Gobat et *al.* (2010), le sol est la couche la plus externe de la croûte terrestre caractérisée par la présence d'organismes vivants. Ce qu'on appelle couramment "sol" est beaucoup mieux désigné par le terme de couverture pédologique (Baize et Jabiol, 1995).

Un sol est un système hétérogène et dynamique, principalement composé de particules minérales, de matières organiques, d'eau, d'air et d'organismes vivants. C'est un milieu biologique où vivent des êtres microscopiques, mais également où se déroulent des phénomènes chimiques et physiques (Eldor, 2007).

I.1.2 Formation d'un sol

La formation des sols (Figure 1) est le résultat des effets des facteurs climatiques, biologiques et anthropiques, entraînant des modifications de la roche mère, ce qui permet la formation d'un horizon d'altération (C) composé de particules de roches. En favorisant l'implantation de la vie, il permet l'accumulation de déchets organiques à la surface du sol ce qui entraîne la formation d'un horizon humifié (A). C'est ainsi que née la couche supérieure fertile du sol où la culture devient possible. Au fur et à mesure que le sol s'approfondit, de nouveaux horizons (B) se forment entre l'horizon d'altération (C) et l'horizon humifère (A) (Figure 01).

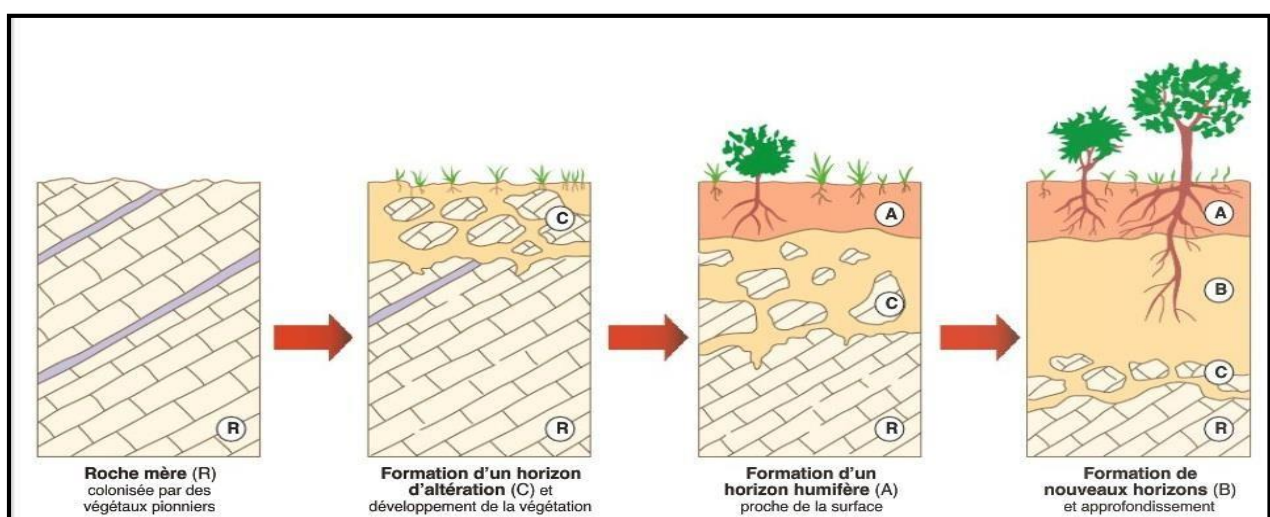


Figure 1 : Formation du sol (FD CIVAM, 2020).

I.2 Composants du sol

I.2.1 Fraction liquide

Cette fraction est constituée d'eau qui contient des substances dissoutes issues de la dégradation des matières organiques et de la désintégration des roches. (Soltner, 2011),

I.2.2 Fraction gazeuse

Elle est représentée par l'air dans les vides du sol. Cette phase est constituée de tout ce qui est gazeux (oxygène <21%, azote 78-80%, dioxyde de carbone 0,02%, vapeur d'eau, autres gaz 1%) (Morel, 1996).

I.2.3 Fraction solide

La phase solide peut être classée en deux catégories (la matière minérale et la matière organique), aussi appelée humus. Les éléments minéraux qui diffèrent par leur forme et leur composition, tels que le gravier, le sable, le limon et l'argile, sont inclus dans cette catégorie. La matière organique, quant à elle, est composée de restes de plantes ou d'animaux à des degrés divers de décomposition (Zaboubi, 2007).

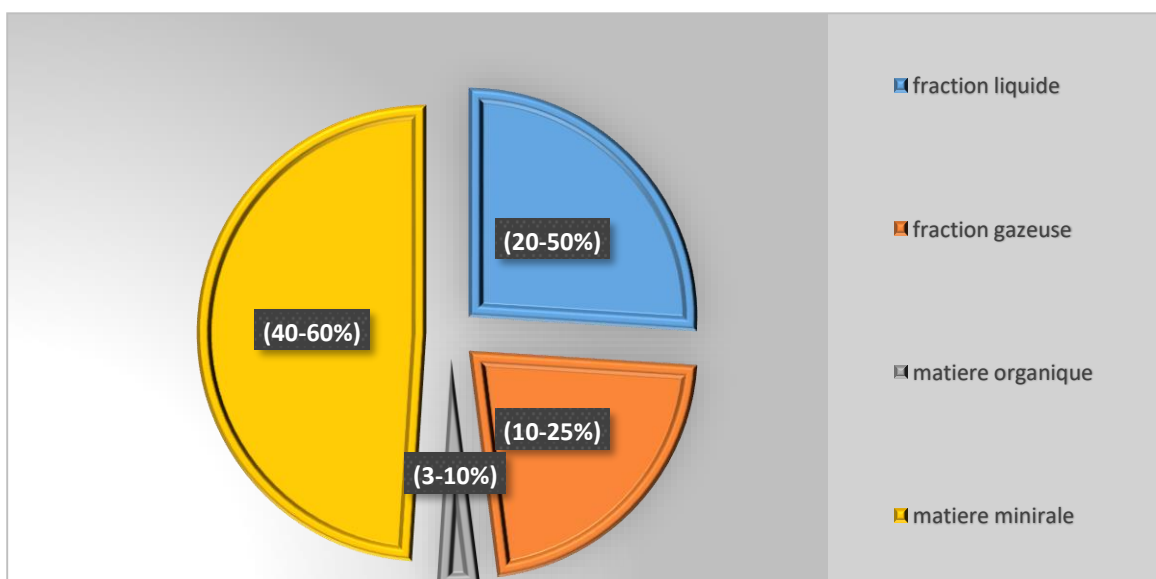


Figure 2: Proportion des principaux composants du sol (White, 2006), Données de la matière organique (Calvet, 2013).

I.3 Propriétés physiques du sol

I.3.1 Texture

La texture reflète la part respective des constituants triés selon leur taille. On distingue la texture minérale qui est la proportion des sables, limon et argile mesurer par l'analyse granulométrique, et la texture organique qui reflète la proportion des fibres et de matériel fin micro agrégé dans les matériaux holorganiques. Leur répartition est habituellement représentée par un graphique ternaire ou triangle de textures. Gobat et *al.*, (2010).

I.3.2 Structure

La structure d'un sol correspond au mode d'assemblage de ses particules, elle détermine la répartition des solides et des vides (pores) dans l'espace (Duchaufour, 2001). A la vue et au toucher, divers types de structures sont distinguées, la structure élémentaire (les terres sableuses), la structure compacte ou massive (ou aucun vide n'existe) et la structure fragmentaire (structure des meilleures terres de culture) (Koller, 2009).

I.3.3 Porosité

La porosité désigne la fraction du volume total du sol occupé par des vides (eau, air). Elle se caractérise par la distribution de la taille des pores, par leur forme et leur connectivité (Carolina, 2015).

Selon Gobat et *al.*, 2010 Trois classes de tailles de pores peuvent être distinguées

- Macro-porosité (vide $>50\mu\text{m}$ retenant l'eau utilisable par les plants).
- Méso-porosité (vide $0,2$ à $50\mu\text{m}$ retenant l'eau utilisable par les plants).
- Et micro-porosité (vide $<0,2\mu\text{m}$ retiennent l'eau inutilisable).

I.3.4 Régime hydrique du sol

Le régime hydrique du sol est déterminé par les fluctuations de la teneur en eau du sol tout au long de l'année. Il est directement influencé par les trois propriétés mentionnées précédemment, à savoir

- La texture qui détermine les forces de rétention de l'eau.
- La structure qui influence la circulation de l'eau
- La porosité qui définit le volume du réservoir hydrique du sol (Gobat et *al.*, 2010).

I.3.5 Perméabilité du sol

La perméabilité du sol se réfère à sa capacité à permettre le passage de l'eau, en réponse à un gradient hydraulique, elle est influencée par (la texture, la structure et la porosité du sol) (Jouanin, 2004).

I.3.6 Température

La température exerce une influence sur l'intensité et la vitesse de divers processus physiques et biologiques tels que la germination, la croissance racinaire et l'activité de la microflore (Koller, 2004).

I.4 Propriétés chimiques

I.4.1 Potentiel d'hydrogène

Le pH d'un sol est la mesure de la concentration d'ions H^+ dans sa solution. Cette concentration d'ions représente l'acidité effective, ou actuelle, ou encore réelle du sol (Soltner, 2011). Un sol est dit

- Acide pour un pH en eau inférieur à 6,8.
- Neutre pour un pH en eau compris entre 6,8 et 7.
- Alcalin ou basique pour un pH en eau entre 7 et 7,2.

Selon Bonneau et Souchier, (1994).

I.4.2 Capacité d'échange cationique

La capacité d'un sol à retenir les cations sous forme échangeable est un indicateur de sa fertilité. Cette propriété permet de mesurer la capacité du sol à retenir les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des plantes, (Calvet, 2003).

I.4.3 Pouvoir tampon

C'est la capacité du sol à réduire ses variations de pH en cas d'apport d'acide ou de base. Il permet d'évaluer le degré d'évolution d'un sol ainsi que sa résistance potentielle aux polluants atmosphériques. Ce pouvoir tampon est plus élevé quand le sol possède une capacité d'échange cationique importante, c'est-à-dire qu'il contient d'avantage d'argile et d'humus comme complexe absorbant (Gobat et *al.*, 2003).

I.4.4 Conductivité électrique

La conductivité électrique d'une solution du sol est un indice des teneurs en sels solubles dans ce sol. Elle exprime la concentration des solutés ionisables présents dans l'échantillon c'est-à-dire le degré de salinité, (Selon Clément. M, 2009).

I.4.5 Calcaire total

Il agit comme élément granulométrique, mais aussi comme réserve de calcium, en général, assez facilement mobilisable (Clément. M, 2009).

II Hydrocarbures dans le sol

II.1 Définition

Le terme « Hydrocarbures » est une appellation générique qui désigne le pétrole sous toutes ses formes (pétrole brut, le fuel-oil, les résidus d'hydrocarbures et les produits raffinés « condensats », huiles minérales, gasoils et essences,...etc.)

Un hydrocarbure est un composé organique contenant exclusivement des atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H) (Heider et *al.*, 1999), où le carbone présente 83 à 87% en volume et l'hydrogène 10 à 14 % (Durousset, 1999).

II.2 Classification des hydrocarbures

En générale, les hydrocarbures sont classés en fonction de leur structure (Figure3). C'est le classement le plus employé en raison de l'importance de l'arrangement moléculaire sur le devenir et la mobilité de ces molécules dans l'environnement (Gomez, 2010).

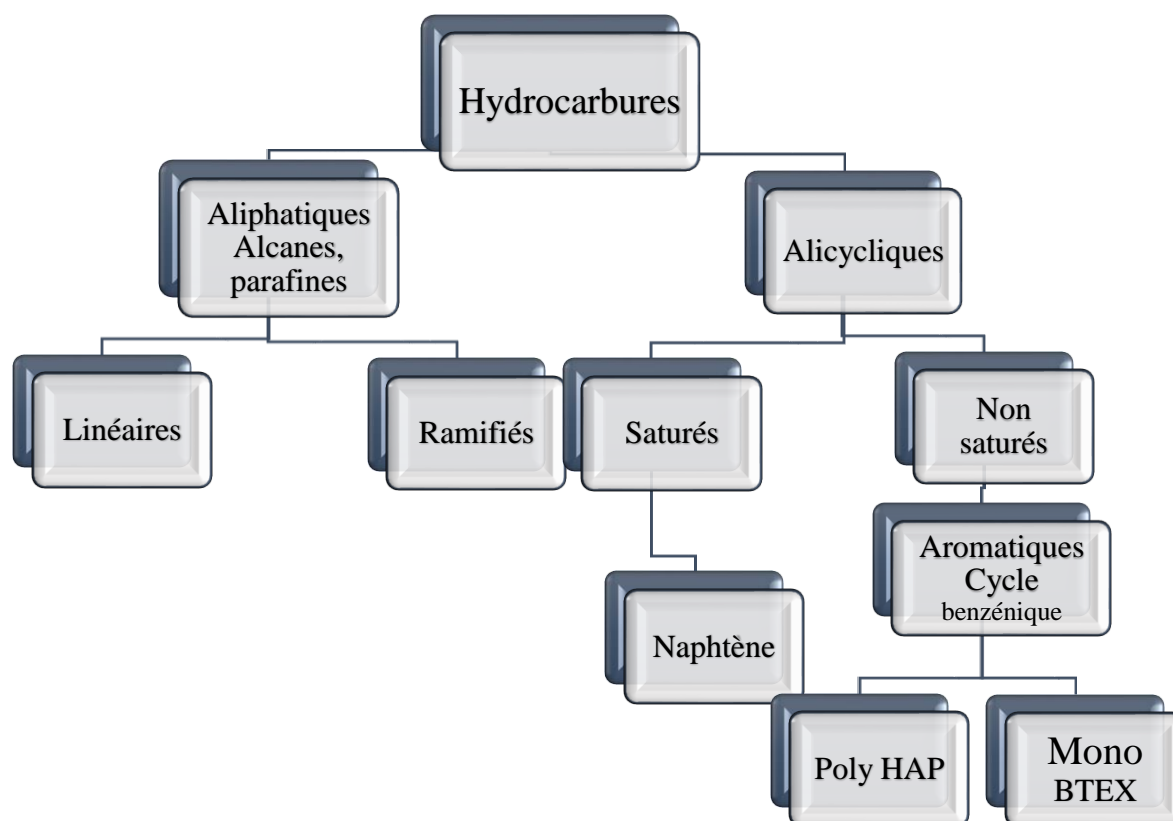


Figure 3 : Classification des hydrocarbures en fonction de leur structure (Gomez, 2010).

On peut aussi les regrouper en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine

- Les hydrocarbures saturés (20 à 70%).
- Les hydrocarbures aromatiques et poly aromatiques (20 à 40%).
- Les composés polaires (5 à 25%).
- Les asphaltènes (0 à 10%).

II.2.1 Hydrocarbures saturés

Sont appelés alcanes linéaires ou ramifiés ou cycloalcanes leur formule chimique s'écrit C_nH_{2n+2} pour les cycloalcanes monocycliques et leurs chaînes carbonnées ne comptent que des liaisons chimiques simples (Fattal, 2008).

II.2.1.1 Alcanes linéaires (n-alcanes)

Ils ont une longueur de chaîne variant de 7 à 40 atomes de carbone, ils constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut) (Arnaud, 1983).

II.2.1.2 Alcanes ramifiés

Ces composés se trouvent dans le pétrole brut à des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes (les alcanes linéaires), (Fattal, 2008).

II.2.1.3 Cycloalcanes

Cette famille renferme des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués, elle peut représenter entre 30 et 40% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut, (Arnaud, 1983).

II.2.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Ces composés sont dominés par des composés di- et tri-aromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts, les cycles aromatiques peuvent être agencés de manière linéaire (anthracène), angulaire (phénanthrène) ou groupé (pyrène). Au sens strict, ils ne contiennent donc que des atomes de carbone et d'hydrogène (Vandecasteele, 2005, Seo et al., 2009).

II.2.3 Composés polaires

Composés polaires correspondent à des molécules hétérocycliques, tels que

- Des composés oxygénés (ex phénols, acides carboxyliques...etc.)
- Des composés soufrés (ex sulfures, disulfures...etc.)
- Les composés azotés (ex pyridines, quinoleines...etc.), Hassaine (2016).

II.2.4 Résines et asphaltènes

Les composés appartenant à la fraction des résines et asphaltènes peuvent être complexés à des éléments autres que l'hydrogène et le carbone tels que l'azote, l'oxygène et le soufre pour former des hétéro éléments. Ces éléments peuvent également être complexés à des métaux lourds, tels que le nickel et le vanadium, généralement présents à l'état de trace dans les pétroles (Tissot et Welte, 1984).

II.3 Sources des hydrocarbures

Les hydrocarbures sont considérés comme étant des polluants à la fois organiques et chimiques. La pollution par les hydrocarbures des sols est due à des rejets, volontaires ou involontaires, des produits pétroliers (Koller, 2009).

II.3.1 Sources naturelles

Les hydrocarbures sont produits par les végétaux essentiellement les hydrocarbures aliphatiques qui se trouvent dans les algues, déchets microbiens ou les cires des végétaux supérieurs les hydrocarbures sont aussi produits par les incendies de forêt, de prairie et les éruptions volcaniques (Barriuso et *al.*, 1996).

Certains de ces hydrocarbures tels que hydrocarbures aromatiques polycycliques peuvent avoir une origine naturelle (ex sols des hêtres autour des lacs ou les sols des forêts de sapins) (Lemière et *al.* 2001).

II.3.2 Source anthropiques

Les sources anthropiques des hydrocarbures sont majoritaires. Les hydrocarbures sont liés aux activités industrielles, urbaines et énergétiques tels que les industries des hydrocarbures (brai de goudron, épandage de boues, les le processus de production et de dispersion de matières créosotées (chemins de fer), (Whitacre et *al.*, 2008), aussi les accidents de la route, la mise en décharge non contrôlée...etc. (Chaineau et *al.*, 2000).

D'après Crepineau et *al* (2003), les concentrations des quantités d'hydrocarbures contaminant les sols peuvent être très importantes à proximité de la source émettrice, elles diminuent de manière exponentielle en fonction de la distance de ce site.

II.4 Cas de station-service

Les stations-service sont une source importante de pollution dans les zones urbaines. L'exploitation de ces établissements peut causer des nuisances non seulement pour les voisins immédiats, mais aussi pour l'environnement dans son ensemble.

La pollution des sols et des sous-sols provenant des stations-service peut être classée en deux catégories distinctes, (Patej, 2002).

II.4.1.1 Pollution chronique

Cette forme de pollution est généralement causée par la corrosion des réservoirs et des canalisations enterrées. Elle se produit sur une longue période et peut entraîner une libération continue de substances polluantes (Patej, 2002).

II.4.1.2 Pollution accidentelle

Il s'agit d'une pollution causée par des déversements d'hydrocarbures lors du remplissage des réservoirs de la station ou pendant la distribution de carburant. Ces incidents sont généralement ponctuels mais peuvent avoir un impact significatif sur l'environnement (Patej, 2002).

II.5 Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

D'après Guermouche (2014), C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être déplacé, transformé ou éliminé, après avoir été diffusé dans l'environnement. Parmi les différentes transformations que peut subir un hydrocarbure, on citera

II.5.1 Transformations abiotiques

Les pertes abiotiques des hydrocarbures sont uniquement dues à des phénomènes d'ordre physique et chimique. Aucune action d'organisme vivant n'intervient. Elle serait responsable de la perte de 20% des hydrocarbures aromatiques à 2 et 3 cycles dans le sol (Park et *al.*, 2001). Les phénomènes de transformation abiotique des hydrocarbures peuvent se traduire principalement comme suit,

II.5.1.1 Oxydation atmosphérique

Les hydrocarbures peuvent subir des réactions d'oxydation lorsqu'ils sont exposés à l'oxygène de l'air. Cela peut conduire à la formation de composés oxygénés tels que les aldéhydes, les cétones, les acides carboxyliques et les peroxydes, Guermouche, (2014).

II.5.1.2 Photo-oxydation

L'exposition des hydrocarbures à la lumière ultraviolette (UV) du soleil peut accélérer leur oxydation. Cela peut entraîner la formation de radicaux libres et de peroxydes, ce qui peut rendre les hydrocarbures plus réactifs et plus susceptibles de réagir avec d'autres composés chimiques présents dans l'environnement, Guermouche, (2014).

II.5.1.3 Pyrolyse

La pyrolyse est un processus de décomposition thermique des hydrocarbures en l'absence d'oxygène. Elle peut se produire naturellement lors de feux de forêt ou de l'éruption de volcans. La pyrolyse peut également être utilisée de manière contrôlée dans des procédés industriels pour produire des produits pétrochimiques. (Guermouche, 2014).

II.5.1.4 Hydrogénation

Dans certaines conditions de température et de pression, les hydrocarbures peuvent subir une réaction d'hydrogénation, où des molécules d'hydrogène se fixent aux liaisons carbone pour former des hydrocarbures plus saturés. (Guermouche, 2014).

II.5.2 Transformation biotique

II.5.2.1 Biodégradation par les microorganismes

La biodégradation des hydrocarbures se fait dans des milieux aérobies et anaérobies grâce à des microorganismes (Fattal, 2008).

Le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement est la biodégradation, les microorganismes en sont responsables, en particulier les bactéries et les champignons (Mortet, 2019), ces derniers peuvent dégrader les polluants organiques dans le sol, tels que les hydrocarbures, et leurs produits de dégradation deviennent de nouvelles sources de carbone dans le sol. Toutefois, tous les composés organiques ne seront pas dégradés de la même façon (Chaineau et *al.*, 1997).

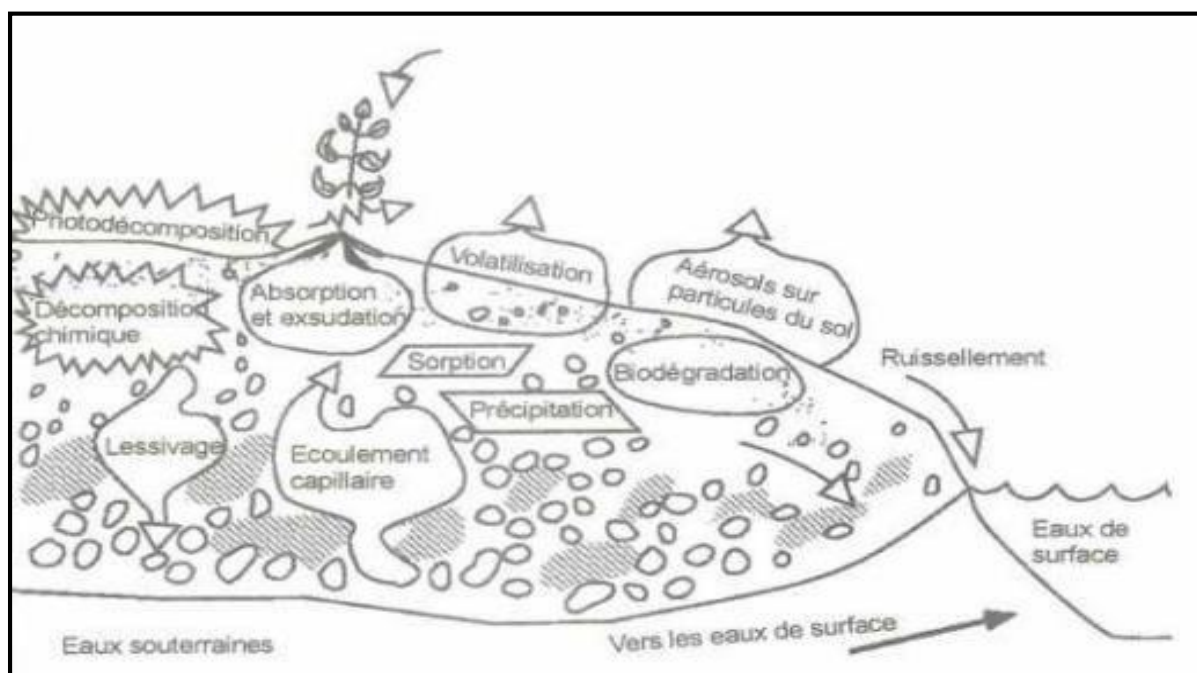


Figure 6 : Devenir d'un polluant dans le sol (Lemière et *al.*, 2001)

II.6 Effets des hydrocarbures sur l'environnement

La pollution par les hydrocarbures pose d'importants problèmes dans l'environnement vis-à-vis des microorganismes, des plantes, des animaux et de la santé humaine. En raison de leur caractère liposoluble, les hydrocarbures peuvent s'accumuler dans la faune et la flore et tout au long de la chaîne trophique (Ramade, 2007).

Le type d'hydrocarbures, la durée du contact, la quantité déversée et surtout le niveau de toxicité, influe sur l'importance de l'impact (Fattal, 2008).

II.6.1 Effets sur le Sol

Le sol étant le support indispensable aux animaux, aux végétaux terrestres et à l'homme, toute pollution de celui-ci retentira sur la flore, la faune et sur l'homme lui-même (Koller, 2004).

La pollution des sols par des hydrocarbures est plus importante notamment autour des raffineries de pétrole et autres installations industrielles. Les résultats de beaucoup d'études ont affirmé des concentrations en hydrocarbures très au-dessus des normes dans des sols à proximité des stations-service (Borowiec et *al.*, 2008 ; Parvizi Mosaed et *al.*, 2015).

II.6.1.1 Effets sur les paramètres physique

Peu d'études ont été menées sur l'effet des hydrocarbures sur les propriétés physiques du sol. Cependant, certaines observations ont été faites par différents auteurs. Selon Rouquerol et *al.*

(1987), les hydrocarbures enrobent les particules minérales du sol et favorisent leur dispersion. Sutton et *al.* (2013) soutiennent que la présence de ces polluants peut améliorer la stabilité structurale du sol, augmenter sa rétention en eau et réduire sa mouillabilité. Cependant, d'autres auteurs, tels que Onojake et Osuji (2012), ont démontré que les hydrocarbures peuvent réduire l'humidité et la capacité de rétention d'eau du sol. Il est important de noter que les effets des hydrocarbures sur les propriétés physiques du sol peuvent varier en fonction de plusieurs facteurs.

II.6.1.2 Effets sur paramètres chimique

Selon Chaineau et *al.* (1997), les effets des hydrocarbures sur la chimie du sol comprennent généralement l'augmentation de la concentration en oligo-éléments tels que le manganèse, le zinc, le fer, le plomb. La diminution de la teneur de certains sels minéraux, comme le phosphore (P) et le potassium (K), une augmentation du carbone organique total (C). L'augmentation de la CE qui entraîne une inhibition de certaines plantes très sensibles à la présence de sel. Une baisse du pH du sol.

II.6.1.3 Effets sur les paramètres biologiques

L'effet des hydrocarbures sur l'activité biologique du sol dépend de plusieurs facteurs tels que leur nature, leur concentration et d'autres caractéristiques du milieu environnant (Duchaufour, 1991). Les composés organiques présents dans les hydrocarbures peuvent avoir un effet inhibiteur sur la croissance et le métabolisme des microorganismes du sol. Cette inhibition est attribuée à la formation de métabolites toxiques. et aussi aux interactions des composés hydrophobes des hydrocarbures avec la membrane cellulaire des microorganismes (Girard et *al.*, 2005).

II.6.2 Effets sur la végétation et la faune

Plusieurs études ont démontré les effets négatifs des produits pétroliers sur les espèces végétales et animales. La contamination des sols par les hydrocarbures peut entraîner une réduction de la diversité et de l'abondance de la macrofaune du sol (Erstfeld et Snow-Ashbrook, 1999). Les hydrocarbures peuvent avoir des effets sur les processus hormonaux de la croissance et le développement des plantes supérieures, pouvant soit stimuler ces processus dans certains cas, soit les inhiber dans d'autres (Henner, 2000). Ils peuvent également affecter la biométrie et la physiologie des plantes (Hawrot-Paw et *al.*, 2015).

Les hydrocarbures lourds tels que le diesel et le pétrole brut ont des effets négatifs plus importants sur la croissance et la germination des plantes par rapport aux hydrocarbures plus légers comme l'essence (Labud *et al.*, 2007).

II.6.3 Effets sur les eaux

Selon Bergue et Mérienne (1986), lors d'une dispersion d'hydrocarbures sur le sol, ces substances ont tendance à s'étaler à la surface et à pénétrer dans le sol, en fonction de sa nature, de sa structure, ainsi que de la quantité et de la nature du produit déversé. Un hydrocarbure de faible viscosité pénètre rapidement dans un sol sec et poreux, limitant son extension en surface. En revanche, sur un sol argileux saturé d'eau, le produit a tendance à s'étaler plus largement, d'autant plus que sa viscosité est élevée.

En ce qui concerne la contamination des eaux par les activités d'une station-service, deux principales voies sont possibles. La première est la contamination directe des eaux de surface et des eaux souterraines à proximité de la station, causée par des rejets directs, des fuites ou encore par les eaux de ruissellement. La deuxième voie de contamination des eaux est liée à la perturbation du fonctionnement des stations d'épuration, où les eaux usées non conformes aux limites de rejets réglementaires peuvent altérer la qualité des eaux. Ces contaminations peuvent avoir des effets négatifs sur les organismes vivants et la santé des populations qui utilisent ces eaux, rendant également ces eaux inutilisables pour l'agriculture (Dib, 2021).

II.6.4 Effets sur la santé humaine

Nous retrouvons les COV qui présentent de nombreux dangers pour la santé, particulièrement le benzène qui est cancérigène, le CO₂ (gaz à effet de serre), le CO (toxique pour les organismes vivants), les hydrocarbures imbrûlés (potentiellement cancérigènes et contribuent en réagissant avec les oxydes d'azote à la formation d'ozone troposphérique), ainsi que des particules qui peuvent induire des maladies pulmonaires (Administration de l'environnement du Luxembourg, 2014).

III Microbiologie des sols

III.1 Répartition des microorganismes dans le sol

Les microorganismes sont beaucoup plus abondants dans les litières, les horizons de surface et la rhizosphère des plantes, où les conditions énergétiques et nutritionnelles sont les plus favorables (Bonneau et Souchier, 1994).

Tableau 1 : Comparaison en terme de populations microbiennes (UFC /g de sol) entre deux sols différents, l'un rhizosphérique et l'autre non rhizosphérique.

Microorganismes	Sol rhizosphérique	Sol non rhizosphérique
Bactéries	12×10^8	5×10^7
Actinomycètes	46×10^6	7×10^6
Champignons	12×10^5	10^5
Protozoaires	24×10^2	10^5
Algues	5×10^3	27×10^3

III.2 Biodégradation des hydrocarbures

De nombreux types de microorganismes ont la capacité à métaboliser les hydrocarbures, Il y a une multitude d'article sur la dégradation des hydrocarbures par les micro-organismes et il est maintenant accepté qu'aucune espèce, seule, ne dégrade complètement les d'hydrocarbures. Bien qu'il soit largement admis que les bactéries et les champignons sont les principaux dépollueurs des hydrocarbures, les bactéries se sont avérées plus polyvalentes que les champignons et peuvent donc jouer un plus grand rôle pendant la biodégradation des hydrocarbures (Hamamura et *al.*, 2006).

III.3 Bactéries

Les bactéries sont très nombreuses et ont souvent été considérées comme des agents pathogènes et agressifs, responsables de maladies plus ou moins graves, le corps humain est colonisé par de nombreuses bactéries qui constituent la « flore commensale » (Heart, 2006).

Par exemple, au niveau du système digestif, le microbiote intestinal, largement impliqué dans les processus de digestion et de défense de l'organisme, est composé d'environ mille milliards de bactéries. Certaines de ces bactéries sont utilisées dans l'alimentation ou dans certains médicaments pour rééquilibrer le microbiote et rétablir une fonction digestive normale (Episodes de diarrhées...) (Goulet, 2009).

III.3.1 Définition des bactéries

Les bactéries mesurent entre 0,5 et 10-15 μm . Ce sont des organismes procaryotes qui ne possèdent pas de noyau, mais un ADN chromosomique circulaire situé dans le cytoplasme. De nombreuses bactéries contiennent une autre structure d'ADN extra-chromosomique, appelée plasmide, Elles sont entourées d'une paroi complexe et possèdent souvent des flagelles. (Heart. ; Shears, 2006).

III.3.2 Bactéries dans le sol

Dans les sols, les bactéries représentent le groupe biologique le plus important métaboliquement mais aussi en concentration (10^6 à 10^{10} cellules par gramme de sol sec), Ces microorganismes peuvent jouer un rôle clé dans le fonctionnement de l'écosystème dans des environnements anoxiques et en aidant à la formation et à la stabilisation des agrégats, (Faugier, 2010)

Les régions intérieures des micro-agrégats des sols peuvent constituer un habitat relativement stable et isolé pour les microorganismes, caractérisé par une disponibilité d'eau relativement stable et d'une pression de prédateurs faible. Ces micro agrégats protègent donc les bactéries qui les colonisent de la dessiccation et d'autres substances solubles toxiques exogènes.

Cette étude vise à évaluer l'impact des hydrocarbures sur les paramètres physico-chimiques et la microflore bactérienne des sols situés à la station-service de Fréha. Afin d'atteindre cet objectif, des analyses au laboratoire ont été réalisées à la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

I. Présentation générale de la station-service de Fréha

C'est une station-service privée répondant à toutes les réglementations, elle se situe aux abords de la route nationale N°12 sur la commune de Fréha. Après avoir détecté deux points principaux de rejet d'hydrocarbure sur les lieux, il a été décidé de sélectionner une zone à proximité de la station pour une étude plus approfondie.

- Présence de rejets importants d'hydrocarbure à proximité de la station-service ;
- Présence de plusieurs sources de rejet (02 sources majeures) sur la station ;
- Cette station est entourée par des terres agricoles ;
- Présence d'une végétation dans le site pollué ;
- Site accessible et d'une surface très étendue ;
- Le gérant a donné son accord pour le déroulement de l'étude.

I.1 Présentation de la commune de Fréha

Selon les données dévoilées par le plan directeur d'aménagement et de l'urbanisme (PDAU) en 2011, la commune de Fréha relevé de la circonscription administrative de la daïra d'Azazga, Elle est située à 30km de la wilaya de Tizi-Ouzou, en partie, sur le bassin versant sud de la chaîne côtière. Elle s'étend sur une superficie de 68,55km².

L'altitude moyenne de la commune est de 350m. Elle présente une géographie à double aspects : les plaines et les montagnes (DUC Tizi-Ouzou, 2011).

Le climat de la commune est méditerranéen de type continental avec des hivers très froids et des étés très chauds (température en hiver inférieure à 10°C, et température en été supérieure à 35°C). Les précipitations au niveau de la commune sont de l'ordre de 850mm/ans (DUC Tizi-Ouzou, 2011). D'après la direction de la programmation et du suivi budgétaire de la wilaya de Tizi-Ouzou (2019) sa population s'élève à 26 763 habitants. Elle est délimitée comme suite :

- Nord et Nord-Est : Communes d'Aghribs et de Timizart ;
- Est : Daïra d'Azazga ;
- Ouest et Sud-Ouest : Communes d'Ouaguenoun et de Timizart ;
- Sud et Sud-Est : Communes de Mekla et l'oued Sebaou.

Les figures 05 présentent la situation géographique de la région d'étude.



Figure 05 : situation géographique de la région de Fréha (Google maps, 2017).

I.2 Description de l'environnement immédiat de la station

Le site d'étude se situe juste à l'entrée de la station-service de Fréha. À proximité immédiate de ce site, on trouve des terrains agricoles à l'ouest. À l'est, se trouve la RN 12, une route principale. Au nord, il y a un cours d'eau, et au sud, un chantier en construction est présent. Du côté est de la RN 12, diverses constructions commerciales, industrielles et résidentielles sont présentes. L'Oued Sebaou se trouve à environ 470 mètres à l'ouest de la station-service. La description de l'environnement immédiat du site d'étude est représentée sur la figure 06.



Figure 06 : Vue globale du site d'étude avec la description de l'environnement (Live Earth Map 2023).

II. Matériel

Le matériel utilisée pour échantillonnage et les différentes analyses sont cité en annexes 1

II.1 Sol

L'étude expérimentale a porté sur des échantillons de sol provenant d'une station-service à Fréha, qui a été accidentellement contaminé par des hydrocarbures utilisés dans la station, tels que l'essence et le gasoil. Cette contamination est le résultat des rejets provenant de différentes sources. Parmi les principales causes de cette pollution du sol, on peut mentionner :

- La corrosion des cuves de stockage.
- Canalisation entre les citernes.
- Points de remplissage.
- Ilots de pompes.

III. Méthodes

III.1 Echantillonnage du sol

L'échantillonnage est réalisé au mois d'avril. Nous avons entamé notre travail expérimental par le choix de 3 strates, en fonction d'un gradient de pollution. Ces strates sont situées à une distance d'un mètre les unes des autres

- La première strate (St1) est située juste à côté des fuites d'hydrocarbures et représente un sol fortement pollué.
- La deuxième strate (St2) est située à une certaine distance des fuites d'hydrocarbures.
- La troisième strate (St3) est loin du milieu pollué.

Les échantillons ont été extraits à l'aide d'un quadra (25X25) à une profondeur de 15 cm de la surface. Ces derniers sont mis dans des sacs à zip étiqueter et transportés à l'obscurité dans une glacière au laboratoire où ils sont conservés au frais pour les paramètres physico-chimiques et pour les analyses microbiologie en a directement entamé le travail.

III.1.1 Préparation du sol

Les échantillons récoltés sur le terrain ont été mis à sécher à une température ambiante jusqu'à poids constant. Ils sont, ensuite, broyer manuellement et tamisé à l'aide d'un tamis à mailles de 2mm, et ils seront sujet à des analyses physico chimiques.

III.2 Analyse physico-chimiques du sol

III.2.1 Mesure du pH du sol

Le pH du sol a été déterminé sur une suspension aqueuse avec un rapport sol/eau de 2/5. Nous avons pesé 10 g de sol séché et tamisé à 2 mm, auxquels nous avons ajouté 25 mL d'eau distillée. Après agitation manuelle de la suspension pendant 10 minutes à l'aide d'une baguette en verre, suivie d'une décantation de 2 heures, le pH a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (HI2210).

III.2.2 Mesure de l'humidité du sol

Afin de déterminer le taux d'humidité des échantillons, nous avons utilisé une balance de précision pour peser 100 g d'échantillon de sol tamisé à l'aide d'un tamis de 2mm. Ces échantillons ont été placés dans des boîtes de pétri en verre. Les boîtes ont ensuite été placées dans une étuve préchauffée à 100°C pendant 24 heures. Après les 24 heures, les boîtes de pétri ont été transférées dans un dessiccateur contenant un agent dessiccatif pour éliminer toute humidité résiduelle. Une fois le séchage complet du sol obtenu, nous avons procédé à une deuxième pesée du sol. Et cette opération a été réalisée une deuxième fois pour permettre l'évaporation totale de l'humidité présente dans le sol. Enfin nous avons procédé à une dernière pesée du sol pour obtenir sa masse finale.

En effectuant une soustraction entre la masse finale et la masse initiale, nous avons calculé la perte de masse, qui correspond à la quantité d'eau évaporée du sol. Pour obtenir le taux d'humidité du sol.

Taux d'humidité = $\frac{\text{la masse initial} - \text{la masse finale}}{\text{la masse initial}} \times 100$.

III.3 Analyse microbiologique du sol

Nous avons procédé à l'ensemencement, dénombrement, l'isolement, et après purification des colonies, une étude morphologique, biochimique et physiologique est réalisée pour la caractérisation des souches isolées.

III.3.1 Ensemencement par la méthode de suspension- dilution

III.3.1.1 Préparation de l'eau physiologique

La solution est obtenue en mélangeant 4,5g de Na Cl avec 500mL d'eau distillée dans un Erlenmeyer à 500ml, le tout a été mélangé avec un agitateur magnétique pendant 10 minute, puis dans une hotte à flux laminaire, nous avons disposé des tubes à essais sur un portoir, nous avons versé dans chaque tube 9ml d'eau physiologique à l'aide d'une seringue stérile, enfin le tout est stérilisé à l'autoclave pendant 30 min.

III.3.1.2 Préparation de la solution mère

La solution mère est obtenue en mélangeant 1 g de sol contaminé avec 9 mL d'eau physiologique stérile dans un tube à essai, ce qui correspond à la première dilution 10^{-1} . Ensuite, le mélange est agité à l'aide d'un vortex pendant 5 minutes.

III.3.1.3 Préparation des suspensions dilutions

Dans une hotte à flux laminaire, nous avons posé 6 tubes à essais sur un portoir, numérotés de 1 à 6, dans lesquels nous avons versé 9mL d'eau physiologique stérile. Dans le 1er tube à essai, 1mL de la solution mère a été ajouté, c'est la dilution 10^{-2} , Ensuite le tout est mélangé à l'aide d'un vortex puis 1mL de la précédente dilution a été versé dans le 2^{ème} tube à essai ; c'est la dilution 10^{-3} . Nous avons reproduit la même procédure pour chaque tube à essai jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-6} .

III.3.1.4 Préparation du milieu PCA

Le milieu est obtenu en mélangeant 23,5g de PCA avec 1000mL d'eau distille dans un Erlenmeyer à 1000mL, le tout a été mélanger avec un agitateur magnétique à plaque chauffante pendant 30 minute, après autoclavage nous l'avons réchauffé dans un Bain marie. Puit dans une hotte à flux laminaire, nous l'avons reparti la dans des boites de pétri stérile, en fin nous les avons incubées pendant 24h à 30°C pour une éventuelle contamination.

III.3.1.5 L'ensemencement Sur un milieu solidifié en boîte de Petri

Un volume de 0,1 mL de suspension est déposé à l'aide d'une micropipette à la surface d'un milieu gélosé stérile en boîte de Petri. L'échantillon est alors étalé sur tout la surface au moyen d'une tige de verre coudée (l'étaioir Figure 07). De cette façon, les cellules sont réparties sur la totalité de la surface pour former des colonies isolées. Les boites de Petri sont incubées à 30°C pendant 24h.

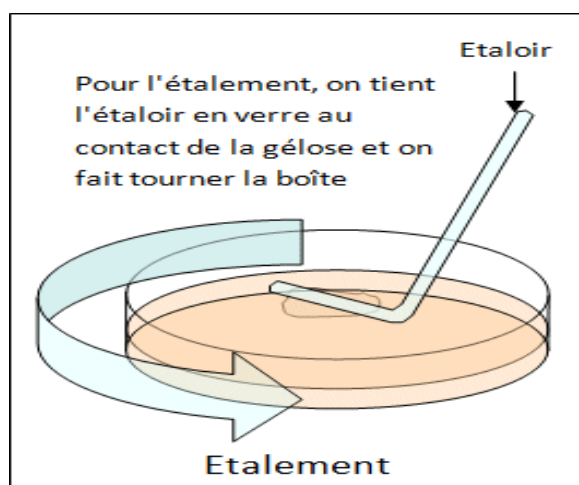


Figure 07 : Ensemencement d'un milieu gélosé en surface par étalement

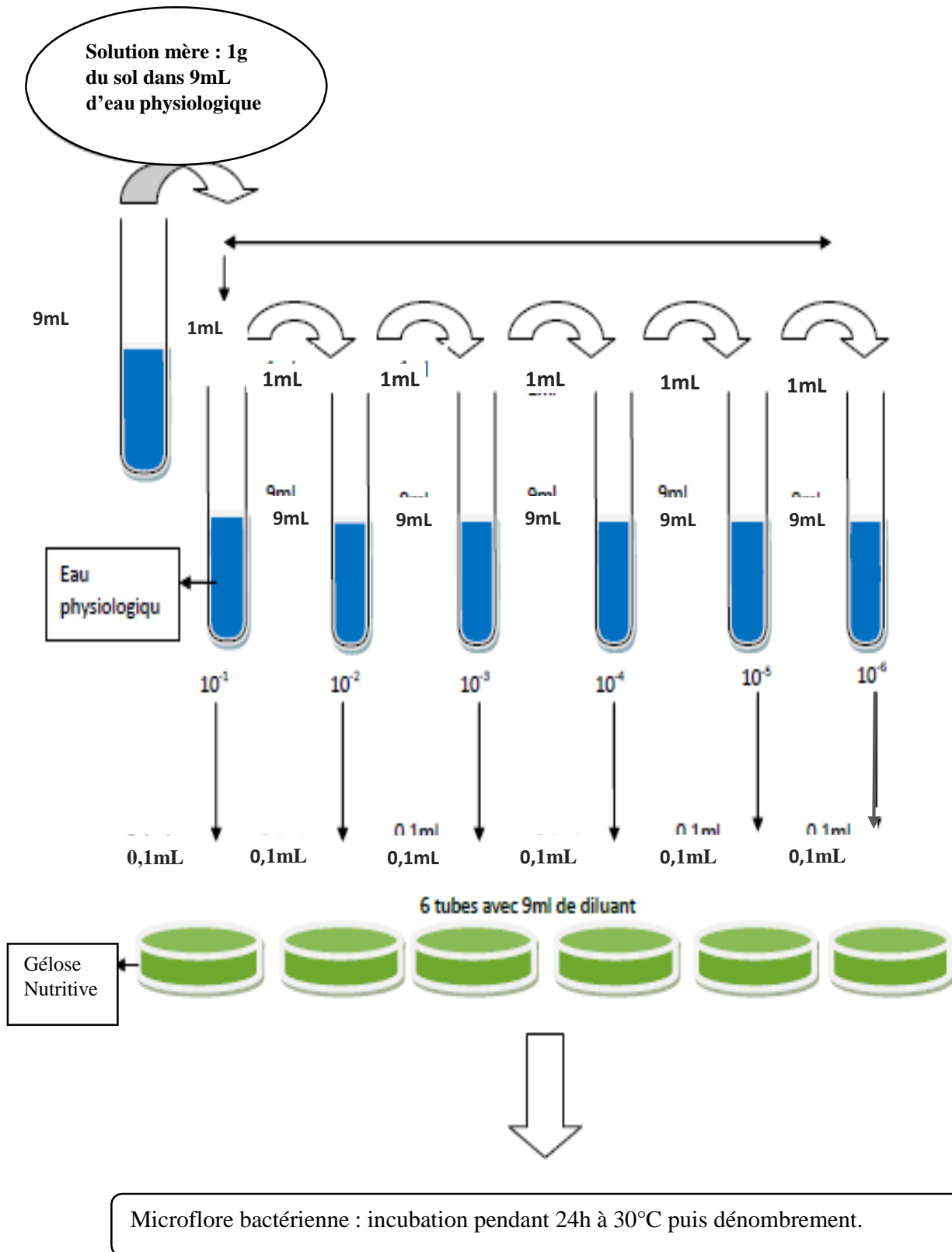


Figure 08 : Schéma récapitulatif des protocoles suivis pour l'isolement des bactéries.

III.3.2 Dénombrement des colonies bactériennes

Une fois l'incubation terminée, les boîtes de Pétri sont examinées et les colonies bactériennes apparaissent comme des amas visibles de cellules bactériennes. Les colonies peuvent varier en taille, en couleur et en forme. On utilise généralement une loupe binoculaire pour faciliter le comptage. Les colonies bactériennes sont comptées sur chaque boîte de Pétri et le nombre total est rapporté en unités de colonies formée.

III.3.3 Isolement et purification des bactéries par épuisement sur trois secteurs ou quadrants

Pour isoler et purifier les colonies bactériennes à partir des boîtes ensemencées, nous avons utilisé la méthode de l'ensemencement sur trois quadrants sur milieu solidifié en boîte de Petri contenant du MH (Milieu de Mueller-Hinton). Cette méthode, réalisée en trois étapes successives, permet d'obtenir des colonies bactériennes distinctes (bien espacées les unes des autres), ce qui permet de retrouver tous les microorganismes d'un mélange, mais aussi de vérifier la pureté des souches bactériennes.

La première étape consiste à inoculer le premier tiers de la boîte en balayant la surface de la gélose avec une anse pour créer des lignes non chevauchantes ou des stries. Ensuite, l'anse est stérilisée et refroidie. Dans la deuxième étape, le deuxième tiers de la boîte est ensemencé en réalisant des stries qui chevauchent légèrement le premier quadrant avec l'anse, afin d'obtenir quelques cellules qui seront étalées sur le deuxième tiers. Enfin, la procédure est répétée sur le troisième secteur pour achever la séparation des bactéries (Figure09).

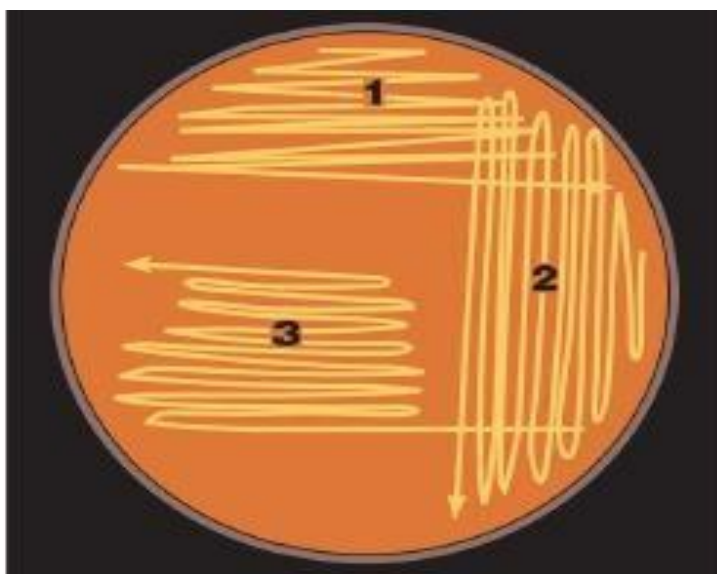


Figure 09 : Ensemencement sur trois quadrants

III.4 Caractérisation des souches bactériennes

Une fois les colonies purifiées, une analyse approfondie de la morphologie, de la biochimie et de la physiologie est entreprise pour caractériser les souches bactériennes isolées. Cette étude permet de recueillir des informations détaillées sur les caractéristiques morphologiques, les réactions biochimiques et les comportements physiologiques propres à chaque souche bactérienne, ce qui facilite leur identification et leur classification.

III.4.1 Etude morphologique

III.4.1.1 Etude macroscopique

L'examen macroscopique des colonies obtenues sur boîtes de Pétri est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu de culture utilisé, de la durée et de la température d'incubation. Cet examen permet la description des colonies, à savoir : la forme, la taille, la couleur, l'opacité, l'aspect de surface et de contour, l'odeur.

III.4.1.2 Etude microscopique

III.4.1.2.1 Observation à l'état frais

Ce test permet la détermination de la forme des cellules, leur mode d'arrangement et leur mobilité au grossissement ($\times 40$).

Préparation du frottis

Déposer délicatement une goutte d'eau stérile sur une lame de microscope propre. Ensuite, à l'aide d'une anse, on prélève une colonie bactérienne de la boîte de Petri contenant la culture. Puis, on dépose doucement la pointe de l'anse dans la goutte d'eau stérile afin de disperser les cellules bactériennes dans le liquide. Une fois les cellules dispersées, il faut recouvrir la goutte d'eau avec une lamelle pour la protéger. Enfin, on utilise un microscope équipé d'un objectif à immersion, avec un grossissement de $\times 40$, pour observer à l'aide de l'huile à immersion les cellules bactériennes.

III.4.1.3 Coloration de Gram

C'est une coloration différentielle ou double coloration qui permet de diviser les bactéries en deux grands groupes (Gram positif et Gram négatif), selon leur affinité pour les colorants liés à la structure générale de leur paroi.

Préparation du frottis

- Nettoyer une lame à l'alcool puis déposer une goutte d'eau sur la lame.
- Prélever une colonie à partir de la boîte de Petri à l'aide d'une anse.
- Frotter la pointe dans la goutte d'eau. Laisser sécher au-dessus de la flamme du bec bunsen puis passer directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.

Coloration

- Recouvrir le frottis de lame avec le violet de Gentiane pendant 1 minute, verser le surplus de la solution puis rincer la lame avec un jet d'eau faible et égoutter l'excès d'eau.
- Déposer quelques gouttes de lugol (composé iodé permet de fixer le violet dans les bactéries) sur le frottis et le laisser agir 45 secondes puis remettre du lugol et le laisser agir 45 secondes et rincer brièvement à l'eau.
- Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Immédiatement après, on rince la lame avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;
 - L'alcool pénètre dans la bactérie, la membrane des Gram (-) est dissoute par l'alcool. La paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, le colorant violet reste dans les bactéries. On est en présence de bactéries Gram (+).
- Contre-colorer en déposant la solution de Fuschine (rose) pendant 1 minute ;
 - Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram (-) décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram (+).
- Rincer la lame en la tenant sous un faible jet d'eau, égoutter l'excès d'eau et laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope à l'aide de l'huile a immersion (au grossissement x1000).

III.4.2 Etude biochimique par les tests classiques

III.4.2.1 Catalase

Elle empêche l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est issue de la voie respiratoire oxydative des bactéries. La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer le H_2O_2 .

Technique

La méthode consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée puis, à l'aide d'une pipette boutonnée, à étaler l'inoculum bactérien.

Résultats

Apparition de bulles d'air et dégagement gazeux : Présence de l'enzyme catalase.

III.4.2.2 Nitrate Réductase

La Nitrate Réductase est capable de catalyser la réaction de réduction de Nitrates (NO_3^-) en Nitrites (NO_2^-) et chez certaines bactéries en azote (N_2).

Technique

Réaliser une culture dans un bouillon nitrate. Incuber à 30°C pendant 24-48 h. Ajouter au moment de la lecture quelques gouttes des réactifs de Griess NR I (acide sulfanilique) et NR II (α naphtylamine). En l'absence de nitrites, rechercher la disparition des nitrates par addition de poudre de zinc qui va réduire les nitrates en nitrites (épreuve de zobell).

Résultats

Le virage immédiat de la couleur du jaune au rouge nous indique que la souche est nitrate réductase positive stade NO_2^- . Si le milieu reste inchangé (jaune), on ajoute alors de la poudre de Zinc. S'il devient rouge le test est négatif, inchangé donc la souche est nitrate réductase positive (stade N_2).

III.4.2.3 Métabolisme glucidique (Test VP et RM)

L'étude des produits terminaux de la glycolyse consiste à faire une différenciation entre la fermentation butylène glycolique (test de Voges Proskauer) et la fermentation acide mixtes (test au Rouge de Méthyl).

Technique

Ensemencer sur le milieu Clarck et Lubs la souche bactérienne à étudier et incuber 24h à 30°C . Après l'incubation, répartir le contenu de ce tube sur 2 autres tubes : l'un servira à la recherche des acides mixtes et l'autre à la recherche de l'acétoïne. Ajouter, respectivement, dans chaque tube 2 gouttes de rouge de méthyle RM et quelques gouttes des réactifs VPI (napht-1-ol en solution éthanol) et VPII (hydroxyde de potassium ou de sodium).

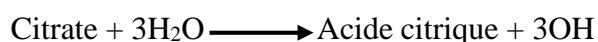
Résultats

Si le milieu vire vers le rouge, la souche est RM+.

Si la réaction se traduit par un virage du milieu au rouge, la souche est VP+.

III.4.2.4 Citrate perméase

Le milieu citrate de Simmons ne contient qu'une seule source de carbone qui est le citrate sous la forme de citrate de sodium. Seules les bactéries possédant la citrate perméase sont capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation du citrate de sodium se traduit par une alcalinisation du milieu selon la réaction suivante :



Technique

Ensemencer en surface par stries serrées et longitudinales la pente du milieu à l'aide d'une pipette chargée de la souche à étudier puis incubé à 30°C pendant 24 heures.

Résultats

Le virage de l'indicateur au bleu indique une alcalinisation du milieu donc la présence de l'enzyme perméase donc la bactérie est citrate positif.

III.4.2.5 Etude du type respiratoire

Ce test est réalisé au moyen des tubes effilés contenant une gélose viande-foie (VF) où la disponibilité de l'oxygène diminue tout en s'éloignant de la surface vers le fond du tube. Ce gradient ainsi créé permet de prédire le type respiratoire des bactéries testées.

Technique

Les tubes gélosés sont régénérés au bain marie à 100°C pendant 20 minutes et maintenus en surfusion à 45-50°C afin d'éliminer toute trace d'oxygène. L'ensemencement se fait par piqûre centrale profonde, la pipette est retirée tout en décrivant des tours de spires. Les tubes sont immédiatement refroidis et incubés à 37°C pendant 24-48 heures.

Lecture

La zone de développement des bactéries décrit leur type respiratoire, ainsi :

- Bactéries aéro-anaérobies facultatives : se développent sur toute la hauteur du tube ;
- Bactéries aérobies strictes : se développent à la surface uniquement ;
- Bactéries micro-aérophiles : se développent à 2 cm environ de la surface ;
- Bactéries anaérobies : se développent au fond du tube.

I. Résultats et discussions

I.1. Tests physico-chimiques

I.1.1. pH du sol

Les résultats obtenus montrent une augmentation du pH en s'éloignant de la source de pollution. Le pH de la strate S1 est légèrement alcalin avec une valeur de 7,7. Alors que le pH du sol des strates S2 et S3 est moyennement alcalin avec la même valeur de 8,03. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 10.

Le pH du sol est un facteur déterminant pour la survie des espèces microbiennes, car elles ont souvent des préférences spécifiques en termes de pH. De plus, le pH du sol peut avoir un impact sur la disponibilité des nutriments, notamment la solubilité du phosphore qui atteint son maximum à un pH de 6,5 (Barden, 1994). La biodégradation des hydrocarbures pétroliers est optimale à un pH neutre (Dana et Bauder, 2011). Elle peut également se produire sur une large gamme de pH, généralement un pH de 6,5 à 8,5 est considéré comme optimal dans la plupart des systèmes aquatiques et terrestres (Joutey et *al.*, 2013).

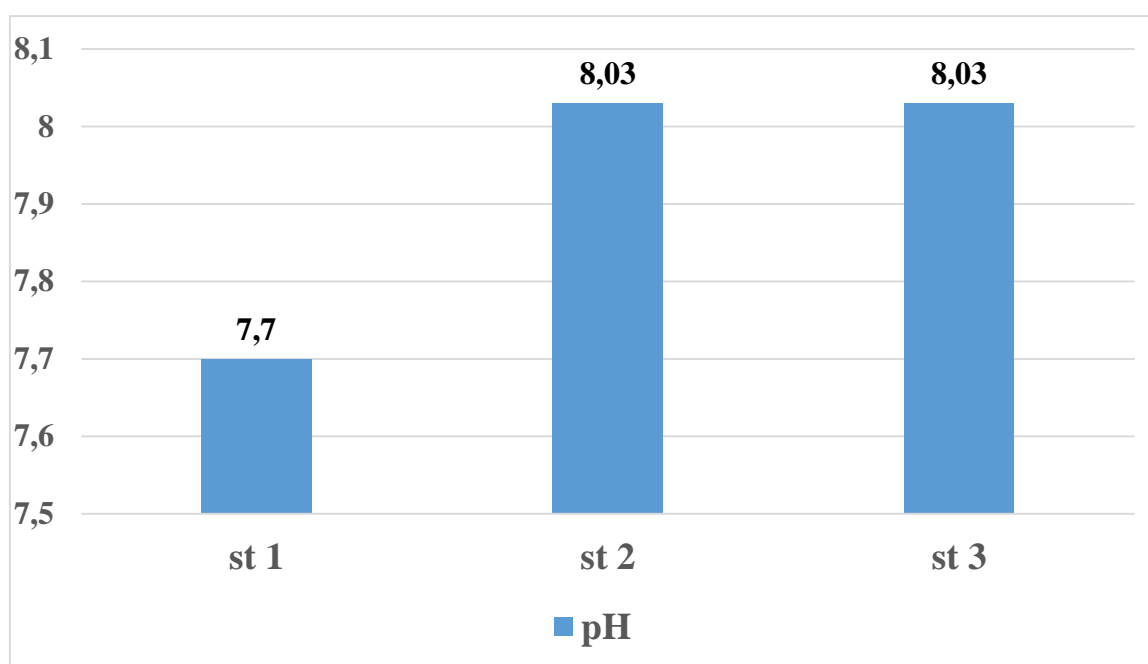


Figure 10 : Variations du pH dans les trois strates.

I.1.2. Humidité du sol

La mesure du taux d'humidité des échantillons des sols contaminés par les hydrocarbures montre des niveaux d'humidité différents de 1,55 % à 2,65 %, par rapport à la source de pollution la "St1" est proche de la pollution avec une humidité de 1,55%, tandis que la "St2" est moyennement proche avec une humidité de 2,47%. En revanche, la "St3" est assez éloigné de la source de pollution avec une humidité de 2,65 %. Les résultats obtenus sont illustrés dans la (figures 11) .

Les différences observées dans les niveaux d'humidité des échantillons de sol peuvent être attribuées à l'effet de la pollution par le pétrole brut. L'humidité est un paramètre important dans les processus de dégradation des composés organiques simples ou complexes. Il est connu que les faibles humidités limitent la vitesse de biodégradation (Perraud, 2004). La teneur en eau est fortement affectée par la texture du sol. Les sols sablonneux peuvent se recharger en humidité rapidement, mais ils sont incapables de retenir l'eau, contrairement aux sols à texture plus lourde (Zaiad, 2010). Il a été noté que l'humidité modérée est préférable pour atteindre un taux optimal de dégradation microbienne dans le sol Cependant, il est également noté que l'activité microbienne ralentit à des niveaux d'humidité bas Cabridenc (1985).

Selon Bergue (1985), a montrent que les parcelles des terres non contaminées par les hydrocarbures ont une humidité importante que celle des parcelles des terres contaminées.

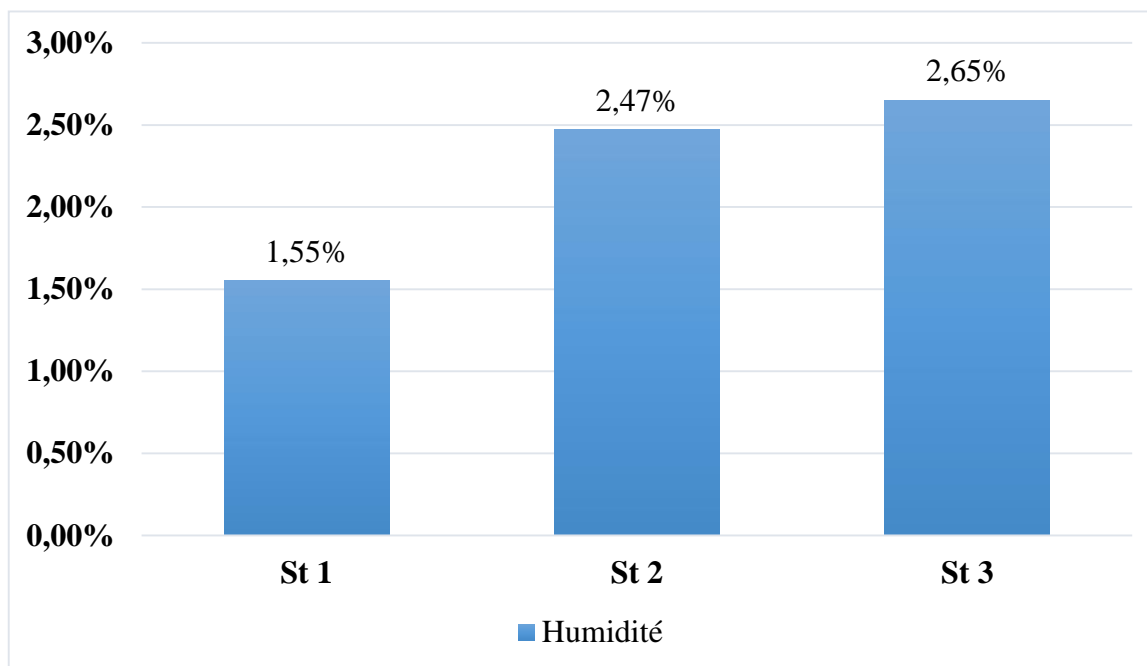


Figure 11: Taux d'humidité des trois strates.

I.2. Résultats de l'étude microbiologique

I.2.1. Dénombrement des colonies sur boîte de Pétri

L'isolement des 3 strates du sol pollués par les hydrocarbures a permis d'obtenir une croissance bactérienne sur le milieu PCA avec une densité de croissance qui décroît de la dilution la plus faible vers la dilution la plus forte avec l'apparition de plusieurs formes de colonies qui se diffèrent par la couleur, la taille. Nous avons observé un taux de croissance importante sur les boîtesensemencées par les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} rendent leur comptage impossible (> a 300 colonie) et le taux de croissance diminué pour les boîtesensemencées par les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} . Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableaux 1.

Tableau 2: Dénombrement des colonies sur boîte de Petri.

Echantillon	Dilution	UFC/g de sol
Echantillon 01 (E01=S1)	10^{-1}	>300
	10^{-2}	>300
	10^{-3}	284
	10^{-4}	175
	10^{-5}	80
	10^{-6}	<30
Echantillon 02 (E02=S3)	10^{-1}	>300
	10^{-2}	160
	10^{-3}	Envahissante
	10^{-4}	Envahissante
	10^{-5}	50
	10^{-6}	<30
Echantillon 03 (E03=S6)	10^{-1}	>300
	10^{-2}	>300
	10^{-3}	93
	10^{-4}	Envahissante
	10^{-5}	42
	10^{-6}	Envahissante

Le décompte bactérien total a révélé des variations significatives entre les échantillons des différentes strates du sol, en se basant sur la dilution 10^{-5} , les décomptes bactériens les plus élevés ont été observés dans l'échantillon du sol de St1 (80×10^{-5} colonie/g de sol) et diminuent dans la St2 ($10^{-5} \times 50$ colonie/g de sol) jusqu'à atteindre (42×10^{-5} colonie/g de sol) dans la St3.

I.2.2. Isolement, purification et caractérisation macroscopique des souches bactériennes

Après plusieurs repiquages successifs 31 souches bactériennes présentant des morphologies différentes ont été isolées et purifiées, les résultats de la caractérisation macroscopique des souches isolées ont révélé une diversité bactérienne importante avec les caractéristiques morphologiques suivantes : des colonies de petite taille, rondes régulières ou irrégulières, opaque de couleur blanche. Elles présentent une surface plate, lisse et brillante, avec une consistance crémeuse. D'autres souches sont de couleur jaune, crème ou orange, avec une opacité translucide ou transparente, une élévation convexe ou légèrement convexe, et une surface rugueuse brillante, lisse mate ou rugueuse mate. La consistance variait entre muqueuse, sèche, filante ou gluante. Ces résultats sont illustrés dans les tableaux 2, 3 et 4 suggèrent une diversité bactérienne présente dans les différents sites pollués par les hydrocarbures, et qui sont potentiellement capables de les dégrader.

Tableau 3 : Caractérisation macroscopique des souches bactériennes isolée.

Aspect								
Souches	Taille	Forme	Contour	Couleur	Opacité	Élévation	Surface	Consistance
E ₁ S ₁	>1mm	Ronde	Irrégulière	Blanche	Opaque	Plate	Rugueuse et mate	Sèche
E ₁ S ₂	<1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Opaque	Légèrement convexe	Lisse et mate	Sèche
E ₁ S ₃	<1mm	Ronde	Régulière	Crème	Translucide	Plate	Lisse et brillante	Crémeuse
E ₁ S ₄	>1mm	Ronde	Régulière	Crème	Translucide	Plate	Lisse et brillante	Crémeuse
E ₁ S ₅	>1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Opaque	Légèrement convexe	Lisse et brillante	Crémeuse
E ₁ S ₆	<1mm	Ronde	Régulière	Jaune	Translucide	Plate	Lisse et brillante	Crémeuse
E ₁ S ₇	>1mm	Ronde	Régulière	Crème	Translucide	Plate	Lisse et brillante	Crémeuse
E ₁ S ₈	<1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Blanche	Légèrement convexe	Lisse et brillante	Crémeuse
E ₁ S ₉	<1mm	Ronde	Irrégulière	Blanche	Opaque	Plate	Lisse et mate	Sèche
E ₁ S ₁₀		Filamenteuse	Irrégulière	Blanche	Opaque	Plate	Rugueuse et mate	Sèche
E ₂ S ₁	<1mm	Crénelée	Irrégulière	Blanche	Transparente	Légèrement convexe	Lisse et brillante	Crémeuse
E ₂ S ₂	<1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Opaque	Légèrement convexe	Lisse et brillante	Crémeuse
E ₂ S ₃	>1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Opaque	Convexe	Lisse et brillante	Crémeuse
E ₂ S ₄	>1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Opaque	Convexe	Lisse et brillante	Crémeuse
E ₂ S ₅	>1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Opaque	Plate	Lisse et brillante	Crémeuse

E₂S₆	>1mm	Ronde	Irrégulière	Blanche	Opaque	Plate	Lisse et mate	Crémeuse
E₂S₇	>1mm	Ronde	Irrégulière	Blanche	Opaque	Plate	Lisse et mate	Crémeuse
E₂S₈	>1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Opaque	Convexe	Lisse et mate	Crémeuse
E₂S₉	<1mm	Ronde	Irrégulière	Blanche	Opaque	Plate	Lisse et brillante	Crémeuse
E₂S₁₀	>1mm	Ronde	Irrégulière	Blanche	Opaque	Plate	Lisse et brillante	Crémeuse
E₂S₁₁	>1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Opaque	Légèrement convexe	Lisse et brillante	Crémeuse
E₃S₁		Filamenteuse	Irrégulière	Blanche	Opaque	Plate	Rugueuse et mate	Sèche
E₃S₂	>1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Opaque	Légèrement convexe	Lisse et brillante	Crémeuse
E₃S₃	>1mm	Ronde	Irrégulière	Blanche	Opaque	Légèrement convexe	Rugueuse et mate	Crémeuse
E₃S₄	>1mm	Ronde	Régulière	Orange	Opaque	Plate	Rugueuse et mate	Muqueuse
E₃S₅	>1mm	Ronde	Régulière	Crème	Opaque	Plate	Lisse et brillante	Crémeuse
E₃S₆	>1mm	Ronde	Irrégulière	Blanche	Opaque	Plate	Rugueuse et brillante	Muqueuse
E₃S₇	>1mm	Ronde	Régulière	Jaune	Opaque	Légèrement convexe	Rugueuse et mate	Crémeuse
E₃S₈	>1mm	Ronde	Irrégulière	Blanche	Opaque	En dôme	Lisse et mate	Filante
E₃S₉	>1mm	Ronde	Irrégulière	Blanche	Opaque	Légèrement convexe	Lisse et mate	Gluante
E₃S₁₀	>1mm	Ronde	Régulière	Blanche	Opaque	Légèrement convexe	Lisse et mate	Crémeuse

I.2.3. Caractérisation microscopique des souches bactériennes isolées

Les résultats de l'observations microscopiques des souches isolées sont présentés dans le Tableau 5. La majorité des isolats bactériens sont des bacilles Gram positifs (67%), certains sont des coccobacilles et des bacilles Gram négatifs (25,80%) et d'autre des Cocci Gram positifs (6,44 %). Ces résultats sont illustres par les tableaux 5, 6, et 7.

Cependant, il est important de noter que parmi toutes les strates, St1 la plus contaminée présente le taux de bacilles à Gram négatif le plus élevé. Avec 50% de bacille à Gram négatif et 50% de bacille à Gram positif Cela suggère que cette strate est plus favorable au développement des bacilles à Gram négatif. Ces résultats concorde avec les résultats Obtenus par (Subathra, K. et *al.*2013), les résultats de leur étude sur 113 souches de bactéries dégradant les hydrocarbures ont démontré une légère prédominance de bacilles à Gram négatif, représentant 52,21% des isolats (comme *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* et *Serratia sp*), tandis que 47,78% se sont révélés être des bactéries à Gram positif (appartenant à deux genres, *Bacillus sp*, et *Micrococcus sp*). Certain exemple sont illustré dans la figure 13.

Tableau 4 : Caractérisation microscopique des souches bactériennes isolées.

Aspect Souches	Etat frais				Etat fixé
	Forme	Arrangement	Mobilité	Spore	Coloration de Gram
E1S1	Bacille	En streptobacille en diplobacilles	Mobile	Non	+
E1S2	Bacille	Isolé	Mobile	Oui	+
E1S3	Bacille	Isolé	Non mobile	Non	-
E1S4	Bacille	En diplobacille ou isolé	Très mobile	Non	-
E1S5	Bacille	En diplobacille ou isolé	Mobile	Non	+
E1S6	Bacille	En diplobacille	Très mobile	Non	-
E1S7	Bacille	Isolé	Mobile	Non	-
E1S8	Bacille	En diplobacille (v)	Non mobile	Non	+
E1S9	Bacille	Isolé	Mobile	Oui	-
E1S10	Bacille	Isolé	Non mobile	Non	+

E₂S₁	Bacille	Isolé	Très mobile	Oui	+
E₂S₂	Bacille	Isolé	Mobile	Oui	+
E₂S₃	Bacille	Isolé	Mobile	Oui	+
E₂S₄	Bacille	Isolé	Faible mobilité	Non	-
E₂S₅	Bacille	Isolé, en diplobacille ou en chaîne	Mobile	Non	+
E₂S₆	Bacille	Isolé ou en chaîne	Mobile	Non	+
E₂S₇	Bacille	Isolé ou en chaîne	Mobile	Non	+
E₂S₈	Bacille	En chaîne ou en diolobacille	Mobile	Non	+
E₂S₉	Cocci	Isolé ou en diplocoque	Non mobile	Non	+
E₂S₁₀	Bacille	Isolé	Non mobile	Oui	+
E₂S₁₁	Cocci	En diplocoque	Non mobile	Non	+
E₃S₁	Bacille	Isolé	Très mobile	Oui	+
E₃S₂	Bacille	Isolé	Très mobile	Oui	+
E₃S₃	Bacille	En diplobacille ou en chaîne	Mobile	Oui	+
E₃S₄	Coccobacille	En diplocoque ou en chaînette	Mobile	Non	-
E₃S₅	Bacille	Isolé ou en diplobacille	Mobile	Non	+
E₃S₆	Bacille	Isolé ou en diplobacille	Mobile	Oui	+
E₃S₇	Bacille	Isolé ou en diplobacille	Mobile	Oui	+
E₃S₈	Bacille	Isolé	Mobile	Non	+
E₃S₉	Bacille	Isolé	Mobile	Non	+
E₃S₁₀	Coccobacille	Isolé ou en diplocoque	Mobile	Non	-

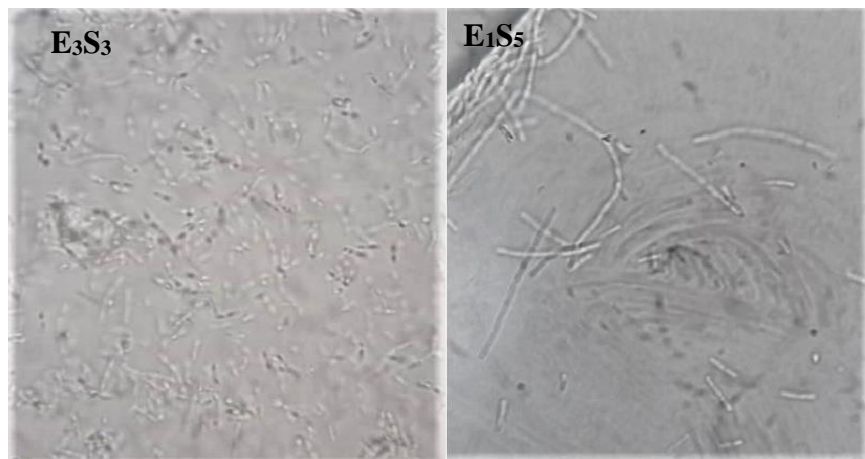


Figure 12 : observation d'état Faris sous microscope

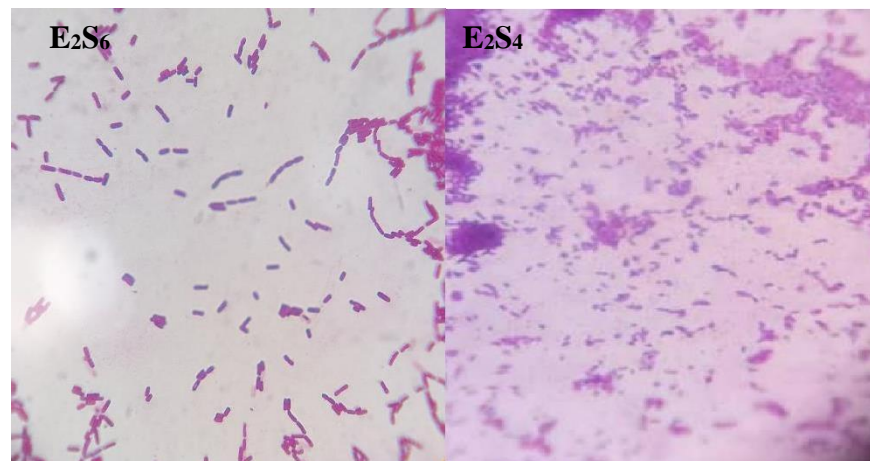


Figure 13 : Coloration de Gram

I.2.4. Tests biochimique

Les résultats des différents tests sont illustrés dans le tableau et en figure dans l'annexe 2

I.2.4.1. Catalase

Tous les souches isolées possèdent la catalase.

I.2.4.2. Métabolisme glucidique (Test VP et RM)

Suite à la réalisation du test (VP et RM), la majorité des souches ont affiché un résultat de RM (+) VP (-). Cependant, certaines souches, principalement issues du premier échantillon, ont montré un profil différent avec un résultat de RM (-) VP (+) ainsi que des souches RM (+) VP (+).

I.2.4.3. Nitrate Réductase

Les résultats obtenus ont montré que 60% des souches étudiées sont capables de catalyser la conversion des nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-). Par ailleurs, certaines souches de l'échantillon 1 sont capables même de réduire les nitrites en azote moléculaire.

I.2.4.4. Citrate perméase

Parmi les 31 souches, 23 possèdent la citrates perméase.

I.2.4.5. Type respiratoire

Les résultats de l'analyse des types respiratoires des souches étudiées ont montré une répartition distincte parmi les différentes catégories. La plupart des souches étudiées ont été classées comme ayant un type respiratoire ANF, ce qui indique qu'elles sont aérobie anaérobies facultatives capables de réaliser la respiration en présence ou en absence d'oxygène. Certaines souches ont été classées comme ayant un type respiratoire aérobie stricte, ce qui signifie qu'elles nécessitent la présence d'oxygène pour effectuer la respiration. Enfin, une seule souche a été identifiée comme ayant un type respiratoire aérobie et microaérobie.

Tableau 5 : Tests biochimiques

Teste Souches	Catalase	Métabolisme glucidique (Test VP et RM)	Nitrate Réductase	Citrate perméase	Type respiratoire
E ₁ S ₁	Positif	RM(-) VP(+)	Positif	Positif	ANF
E ₁ S ₂	Positif	RM(-) VP(+)	Positif	Positif	Aérobie,micro- anaérobie
E ₁ S ₃	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Positif	ANF
E ₁ S ₄	Positif	RM(+) VP(+)	Positif	Positif	ANF
E ₁ S ₅	Positif	RM(-) VP(+)	Positif	Positif	ANF
E ₁ S ₆	Positif	RM(-) VP(+)	Positif	Positif	ANF
E ₁ S ₇	Positif	RM(+) VP(+)	Positif	Positif	ANF
E ₁ S ₈	Positif	RM(+) VP(+)	Positif	Positif	ANF
E ₁ S ₉	Positif	RM(-) VP(+)	Positif	Négatif	AS
E ₁ S ₁₀	Positif	RM(-) VP(+)	Positif	Négatif	ANF
E ₂ S ₁	Positif	RM(-) VP(+)	Négatif	Positif	AS
E ₂ S ₂	Positif	RM(+) VP(-)	Négatif	Négatif	ANF
E ₂ S ₃₁₂	Positif	RM(+) VP(-)	Négatif	Positif	AS
E ₂ S ₄	Positif	RM(+) VP(-)	Négatif	Positif	ANF
E ₂ S ₅	Positif	RM(+) VP(-)	Négatif	Positif	AS
E ₂ S ₆	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Positif	ANF
E ₂ S ₇	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Positif	ANF
E ₂ S ₈	Positif	RM(+) VP(-)	Négatif	Positif	AS
E ₂ S ₉	Positif	RM(+) VP(-)	Négatif	Négatif	ANF
E ₂ S ₁₀	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Positif	ANF
E ₂ S ₁₁	Positif	RM(+) VP(-)	Négatif	Positif	AS
E ₃ S ₁	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Négatif	ANF
E ₃ S ₂	Positif	RM(+) VP(-)	Négatif	Positif	AS
E ₃ S ₃	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Négatif	ANF
E ₃ S ₄	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Négatif	ANF
E ₃ S ₅	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Positif	ANF
E ₃ S ₆	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Positif	ANF
E ₃ S ₇	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Positif	ANF
E ₃ S ₈	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Négatif	AS
E ₃ S ₉	Positif	RM(+) VP(-)	Négatif	Positif	AS
E ₃ S ₁₀	Positif	RM(+) VP(-)	Positif	Positif	ANF

Conclusion

Ce travail a permis d'étudier divers paramètres physiques, chimiques et microbiologiques des sols contaminés par les hydrocarbures dans la station-service de Fréha.

D'après les résultats obtenus, au cours de notre travail nous pouvons conclure que l'action des hydrocarbures se traduit par une augmentation du pH au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la source de pollution. Les sols des strates S1, S2 et S3 présentent des valeurs de pH légèrement alcalines à moyennement alcalines. De plus, la teneur en eau augmente progressivement de la strate la plus proche de la source de pollution aux strates les plus éloignées. Les niveaux d'humidité varient de 1,55% à 2,65%, reflétant les variations selon la proximité de la source de pollution.

Les résultats microbiologiques ont révélé une diversité bactérienne importante dans les différents sites pollués par les hydrocarbures. Les dénombrements bactériens ont montré des variations significatives entre les échantillons des différentes strates du sol, avec des décomptes bactériens les plus élevés dans l'échantillon de la strate S1. La caractérisation macroscopique des 31 isolats bactériens a révélé une variété de caractéristiques morphologiques, suggérant une diversité bactérienne capable de dégrader les hydrocarbures.

Les tests biochimiques ont permis de mettre en évidence la présence d'enzymes telles que la catalase, la citrate perméase et la nitrate réductase dans les souches bactériennes isolées. De plus, la plupart des souches ont montré un profil métabolique glucidique de RM (+) VP (-).

En conclusion, cette étude a mis en évidence l'impact des hydrocarbures sur les paramètres physiques, chimiques et microbiologiques des sols contaminés. Les résultats soulignent l'importance de la proximité de la source de pollution sur le pH du sol et la teneur en eau. De plus, la présence d'une diversité bactérienne dégradant potentiellement les hydrocarbures dans les sols contaminés est prometteuse pour des approches de dépollutions futures.

En perspectives, il serait intéressant de :

- Compléter la caractérisation métabolique des souches bactériennes isolées.
- Identifier ces souches sur le plan moléculaire en utilisant le séquençage de l'ARNr16s.
- Évaluer la capacité de ces souches à dégrader les hydrocarbures.

Conclusion

- Cibler l'isolement des champignons et des microalgues en utilisant les méthodes de cultures.
- Utiliser l'approche Meta génomique pour analyser les communautés microbiennes de ces sites de façon exhaustive.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abbia, S., et Guitoun, L. 2013.** Les méthodes de traitement des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers. Mémoire de Master, Université Kasdi Merbah -Ouargla , 40 p.
- Administration de l'environnement du Luxembourg. 2014.** STATION DE SERVICE (Exp-sta-serv). Administration de l'environnement du Luxembourg.
- Al-Deeb, T. M. et Malkawi H. 2009.** Isolation, molecular and biochemical characterization of oil degrading bacteria from contaminated soil at an oil refinery. Journal of Applied Science and Technology, 14, 1-12.
- ARNAUD, P. 1983.** Cours de Chimie Organique. Enseignement de la Chimie, Tome 1, 505p
- Baize, D. Jabiol B. 1995.** Guide pour la description des sols. Edition I.N.R.A, Paris. 375P.
- Barden, M. 1994.** Naturally occurring biodegradation as a remedial action option for soil contamination. Interim Guidance Publ-Sw515-95. Madison, Wisconsin Department of Natural Resources Emergency and Remedial response Program, p16.
- Barriuso, E., Calvet, R., Scriavon, M. et Soulas, G. 1996.** Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformations et dissipation. Etude et Gestion des Sols, 3(4), 279-296.
- Bergue, J. M. 1985.** La pollution des sols par les hydrocarbures. Service physique-génie urbain, Laboratoire régionale de Rouen. pp. 57- 64.
- Bergue, J.-M., Mérienne, D. 1986.** La pollution des sols par les hydrocarbures. Bulletin de Liaison Des Laboratoires Des Ponts et Chaussées, 146, 57–66.
- Bonneau, M., Souchier, B. 1994.** **Pédologie 2** constituants et propriétés du sol ; 2ème édition. Ed. Masson, 665p
- Borowiec, M., Hoffmann, K., Huculak, M., Rogowski, S., et Hoffmann, J. 2008.** Effect of petrol stations on the contamination of the soil environment. 2-Ch (16), 62–69.
- Cabane, F. 2012.** Lexique d'écologie, d'environnement et d'aménagement du littoral. Version 24. Ifremer : 342 p.
- Cabridenc, R. 1985.** Degradation by microorganisms in soil and water. In Sheehan P. (Ed.), Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Scope 25/John Wiley& Sons, New York.
- Calvet, R., 2013.** Le sol. Tome 2, Edition FA.ENV.AGRICOLE. France Agricole, Paris678P.

Références bibliographiques

- Calvet, R., 2003.** Le sol propriétés et fonctions. France Agricole Editions. 455p.
- Chaineau, C. H., Morel, J. L., et Oudot, J. 2000.** Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize (Vol. 29, No. 2, pp. 569-578). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
- Chaineau, CH, Morel, JL, et Oudot, J. 1997.** Phytotoxicité et absorption par les plantes des hydrocarbures du fioul (vol. 26, n° 6, pp. 1478-1483). Société américaine d'agronomie, Crop Science Society of America et Soil Science Society of America.
- Clément, M., Pieltain, F. 2009.** Analyse chimique des sols. Edition TEC et DOC,387 p.
- Dana, L.D., Bauder, J. W. 2011.** A general essay on bioremediation of contaminated soil. Montana State University, Bozeman, Mont, USA
- Dib, Djaffer. 2021.** thèse de doctorat. Impact de la pollution du sol aux hydrocarbures sur la flore et la pédofaune dans quelques stations-services de la Wilaya de Tizi-Ouzou 148p
- Dilmi, F. 2019.** Isolement et caractérisation des microorganismes capables de dégrader le pétrole de la raffinerie d'arzew. Thèse de doctorat en sciences biologiques. Université Abdelhamid Ibn Badis–Mostaganem, p (212).
- Duchaufour, P. 1991.** Pédologie sol,végétation et environnement. Ed Masson. 289p.
- Duchaufour, P. 2001.** Introduction à la science du sol. Sol, végétation et environnement. 6ème édition. MASSON. Paris Milan Barcelone. 498p.
- Durousset, M. 1999.** Le marché du pétrole. Paris: Collection HISTEGE. 94p.
- Eldor, P. 2007.** Soilmicrobiology. Ecology and Biochemistry. Academic Press; 3rdédition.552p.
- Erstfeld, K. M., Snow-Ashbrook, J. 1999.** Effects of chronic low-level PAH contamination of soil invertebrate communities. Chemosphere, 39(12), 2117–2139. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00421-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00421-4)
- Fattal, P. 2008.** Pollution des côtes par les hydrocarbures. Presse universitaire de Rennes. 498p.

Références bibliographiques

- FD CIVAM.** Fédération Départementale des du Gard Centre d'initiatives pour Valoriser l'Agriculture et le Milieu rural
- Girard, C.M., Walter. et C.H. Berthelin, J. 2005.** Sols et environnement Ed DUNOD,Paris (France). 529 p.
- Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W. 2003.** Le sol vivant. Bases de pédologie – Biologie des sols. 2e édition. Les Presses polytechniques et universitaires romandes,569p
- Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W. 2010.** Le sol vivant. Bases de pédologie-Biologie des sols.3e édition presses polytechniques et universitaires romandes.817P.
- Gomez, D. (2010).** Etude approfondie de l'influence de la nature chimique fine des polluants hydrocarbures sur le calcul du risque sanitaire. Technical report, AXE environnement.(Cité en pages XIX et 11.).
- Goulet, O. La flore intestinale : un monde vivant à préserver.** Journal de pédiatrie et de puériculture (2009) 22, 102—106
- Gruyer, N., Groleau, P., Ouellet, A., et Dupont, R. 2015.** Hydrocarbures pétroliers caractéristiques, devenir et criminalistique environnementale – Études GENV222 et GENV23, Évaluation environnementale stratégique globale sur les hydrocarbures. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 55p.
- Guermouche, M. A., et Rassi, A. (2014).** Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodegradation des hydrocarbures (Doctoral dissertation, thèse de Doctorat), université d'oran).
- Hamamura, N., Olson, S. H., Ward, D. M., & Inskeep, W. P. 2006.** Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. Applied and environmental microbiology, 72(9), 6316-6324.
- Hamzah, A., Rabu A., Azmy R. and Yusoff, N. A. 2010.** Isolation and characterization of bacteria degrading Sumandak and South Angsiols. Sains Malaysiana, 39(2), 161-168.
- Hassaine, A. (2016).** Thèse de doctorat : biodégradation des hydrocarbures (pétrole brut et kérosène) par la microflore microbienne des eaux de la région de Skikda faculté des sciences département de biologie. Université Badji Mokhtar – Annaba. 189p.
- Hawrot-Paw, M., Wijatkowski, A., & Mikiciuk, M. 2015.** Influence of diesel and biodiesel fuel-contaminated soil on microorganisms, growth and development of plants. Plant, Soil and Environment, 61(5), 189–194.

Références bibliographiques

<https://doi.org/10.17221/974/2014-PSE>

- Heart. Shears, P. 2006.** Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences-Flammarion.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R., Widdel, F. 1999.** Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. FEMS. Microbiology. Reviews. 22:459-473.
- Heider, J., Spormann, A. M., Beller, H. R., et Widdel, F. 1998.** Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. FEMS microbiology reviews, 22(5), 459-473.
- Henner, P. 2000.** Phytoremédiation appliquée au traitement de sols contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Thèse de Doctorat en biologie, Institut National Polytechnique de Lorraine).
- Hesham, A. E.-L., Mawad A. M., Mostafa Y. M. et Shoreit A. 2014.** Biodegradation ability and catabolic genes of petroleum-degrading *Sphingo monaskoreensis* strain ASU-06 isolated from Egyptian oily soil. BioMedresearch international.
- Jouannin, F. 2004.** Etude de la mobilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) contenus dans un sol industriel pollué (Thèse de doctorat, Ecole doctorale de chimie de Lyon. 209 p.
- Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., et El Ghachtouli, N. 2013.** Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. Biodegradation-life of science, 1, p289-320.
- Koller, E. 2004.** Traitement des pollutions industrielles: eau, air, déchets, sols, boues. Paris, France:Dunod.
- Koller, E. 2009.** Traitement des pollutions industrielles eau. air. déchets. sols. Boues. :2^{ème} édition, EdtDunod,Paris.
- Labud, V., Carlos G., Teresa H. 2007.** Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. Department of Soil and Water Conservation and Management of Organic Wastes, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, 30100 Espinardo-Murcia, Spain. 9p.
- Labud, V., Garcia, C., & Hernandez, T. 2007.** Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. Chemosphere, 66(10), 1863-1871.
- Lemière, B., Seguin, J. J., Le Guern, C., Guyonnet, D., Baranger, P. 2001.** Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. BRGM éditions, 300, 132p..

Références bibliographiques

- Mazziotti, M. 2017.** Impact des exsudats racinaires de *Miscanthus x giganteus* sur les microorganismes impliqués dans la bioremédiation d'un sol contaminé au benzo (a) anthracène (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Morel, R. 1996.** Les sols cultivés. Institut national agronomique de Paris-Grignon. 2^{ème} édition. 398p
- Moret, A. 2019.** Etude du rôle de quelques plantes graminées et légumineuses dans la phytoremediation des sols pollués par les hydrocarbures (Thèse de Doctorat en biologie , Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis)
- Neff, J.M., Stanley, O., Gardiner, W., Stejskal, I. 2000.** Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental toxicology and chemistry*. Vol :19, Pp 1809–182.
- Noumeur, S. 2008.** Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la
- Onojake, MC et Osuji, LC 2012.** Evaluation des propriétés physico-chimiques des sols contaminés par les hydrocarbures. *Cambre. Appl. Sci. Res* , 4 (1), 48-58.
- Park J.H., Zhao X., Voice T.C. 2001.** Biodegradation of non-desorbable naphthalene in soils. *Environmental Science and Technology*, 35(13), 2734-2740.
- Parvizi., Mosaed, H., Sobhanardakani, S., Merrikhpour, H., Farmany, A., Cheraghi, M., et Ashorlo, S. 2015.** The Effect of Urban Fuel Stations on Soil Contamination with Petroleum Hydrocarbons. *Iranian Journal of Toxicology*, 9(30), 1378–1384.
- Patej, S. 2002.** Etude de scénarios dangereux En stations-service INERIS DRA ; p. 38).
- Perraud, D. 2004.** 12. Réformes et transition : l'étape de la multifonctionnalité agricole. In *La politique agricole commune*. Presses de Sciences Po. pp (365-398).
- Rahman, K. S. M., Thahira-Rahman J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R. et Banat, I. M. 2003.** Enhanced bioremediation of n-alkane in petrole umsludgeusing bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bio ressource technology*, 90(2), 159-168.
- Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie.** Fondements et applications. Edition Tec et Doc. Lavoisier. 618p.
- Rouidi, S. 2014.** Evaluation de la contamination par les hydrocarbures des sédiments superficiels (fluviaux et marins) de la région de Skikda (nord-est algérien). *Analyses statistiques* (Doctoral dissertation, Aix-Marseille).

Références bibliographiques

- Rouidi, S. 2014.** Evaluation de la contamination par les hydrocarbures des sédiments superficiels (fluviaux et marins) de la région de Skikda (nord-est algérien). Analyses statistiques (Doctoral dissertation, Aix-Marseille), 208 p.
- Rouquerol, T., Amir, H. et Amir, A. 1987.** Effet de l'épandage de résidu pétrolier de raffinerie sur l'évolution de la matière organique. L'activité de densité microbienne d'un sol agricole, *Revue d'écologie et biologie du sol*, 156P.
- Seo, J. S., Keum, Y. S., & Li, Q. X. 2009.** Bacterial degradation of aromatic compounds. *International journal of environmental research and public health*, 6(1), 278- 309.
- Singh, C., et Lin, J. 2008.** Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African journal of Biotechnology*, 7(12).
- Soltner, D. 2011.** Les bases de la production végétale (éd. Tome I- le sol et son amélioration 25^{ème} Edition). Collection science et technique agricole, 472 p.
- Subathra, M. K., Immanuel, G., & Suresh, A. H. 2013.** Isolation and Identification of hydrocarbon degrading bacteria from Ennore creek. *Bioinformation*, 9(3), 150.
- Sutton, NB, Maphosa, F., Morillo, JA, Abu Al-Soud, W., Langenhoff, AA, Grotenhuis, T., et Smidt, H. 2013.** Impact de la contamination à long terme par le diesel sur la structure de la communauté microbienne du sol. *Microbiologie appliquée et environnementale*, 79 (2), 619-630.
- Tahar, N. 2005.** Traitement biologique des eaux contaminées par les hydrocarbures dans un bioréacteur à lit fluidisé triphasique (Doctoral dissertation, Alger). 107 Page.
- Técher, D. 2011.** Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus x giganteus*. Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine de Metz discipline : toxicologie de l'environnement, 308 p.
- Tissot, B.P., Welt D. H. 1984.** Petroleum formation and occurrence. Berlin, Heidelberg, New York.
- U.S. Energy Information Administration. (2019).** International—U.S. Energy Information Administration (EIA). <https://www.eia.gov>. <https://www.eia.gov/beta/international/>
- Vandecasteele, J. P. (2005).** Les hydrocarbures naturels dans l'environnement. Microbiologie pétrolière. Technip (ed). Paris: IFP publications, 44-73.

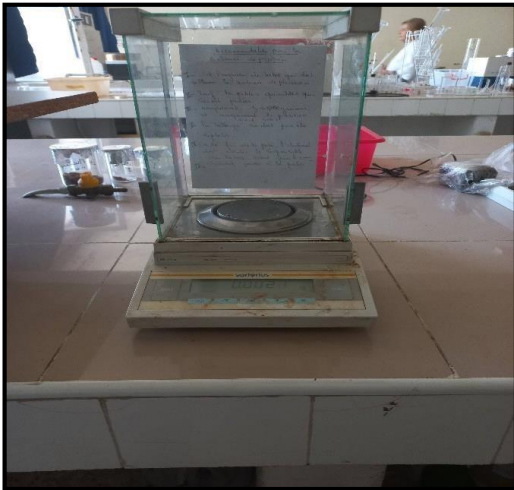
Références bibliographiques

- Whitacre, D. M., Liu, G., Niu, Z., Niekerk, D., Xue, J., et Zheng, L. 2008.** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Coal Combustion: Emissions, Analysis, and Toxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 192, 1-28.
- White, R. E. 2006.** Principles and Practice of Soil Science The soil as a Natural Resource, vol. 32.
- Zaaboubi, S. 2007.** Effets comparatifs de deux outils aratoires (disques-dents) et de différents précédents cultureux sur les propriétés physiques d'un sol cultivé en céréales dans la région de Timgad (Thèse de doctorat en biologie, Batna, Université El Hadj Lakhdar. Faculté des sciences).
- Zaiad, G. M. 2010.** Physico-chemical analysis of soils in Al-Khums City, Libya. *Journal of Applied Sciences Research*, 6(8), 1040-1044.

Annexe 1

Tableau 1 : Matériels et réactifs utilisés

Matériel utilisé sur terrain	Matériel utilisé au laboratoire	Réactifs
Mètre ruban Quadra Des sacs à zip pour transporter le sol Etiquettes Marqueur Glacière	Autoclave ; Becher Balance de précision Erlenmeyer 500mL, 1000mL Etuve Fioles 250mL Pipettes ; Vortex Tubes à essais Compteur de colonies Loupe binoculaire Microscope photonique pH mètre Tamis à 2mm Hôte aspirante Pipettes Pasteur Bec bunsen ; Micropipette Agitateur magnétique Agitateur magnétique à plaque chauffante Seringue Dessiccateur Bain marie Lame et lamelle	Acide sulfanilique ; Bouillon nitrate ; Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) ; D'eau physiologique stérile ; Fuschine ; Gélose viande-foie ; Milieu Clarck et Lubs ; Ethanol à 90° ; Lugol ; Milieu citrate de Simmons ; Milieu Muller Hinton (MH) ; Milieu PCA. ; Na Cl ; Rouge de méthyle RM ; Violet de Gentiane ; VPI (napht-1-ol en solution éthanol) ; VPII (hydroxyde de potassium ou de sodium) ; Poudre de Zinc ; Nphtylamine



Balance de précision



Autoclave



Bain marie



Etuve



Compteur de colonies



Loupe binoculaire



Etuve 100°C



Microscopique

Annexe 02

Catalase

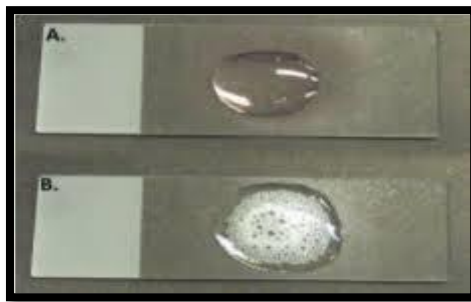


Figure : Test catalase, A négatif et B positif

Métabolisme glucidique (Test VP et RM)



Figure : Test du VP-RM

À gauche : Test du Rouge de Méthyl (A) Négatif, (B) Positif.

À droite : Test du Voges-Proskauer (A) Négatif, (B) Positif.

Nitrate Réductase

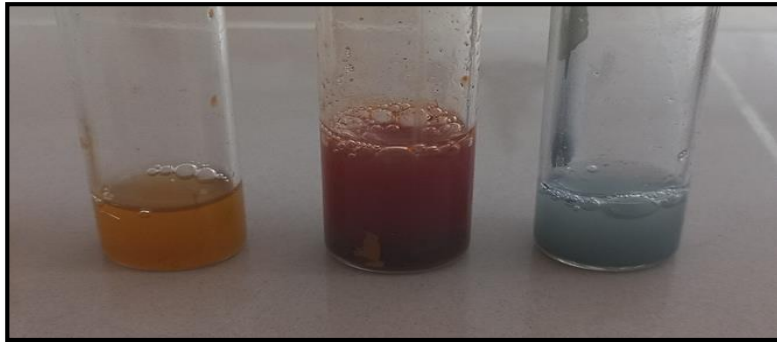


Figure : Test de la nitrate réductase

(A) : Négatif après l'ajout de NRI et NRII, (B) : Négatif après l'ajout de NR1 et NR2 et la poudre de zinc (C) : Positif après l'ajout de NR1 et NR2 et la poudre de zinc,

Citrate perméase



Figure : Test du citrate perméase

Type respiratoire



Figure : Test de respiration

Résumé

Divers paramètres physiques, chimiques et microbiologiques des sols contaminés par les hydrocarbures dans une station-service de Fréha ont été étudiés. Les résultats indiquent une augmentation du pH et de la teneur en eau à mesure que l'on s'éloigne de la source de pollution. Une diversité bactérienne importante a été observée, avec des dénombrements bactériens élevés dans la strate la plus proche de la source de pollution. Les tests biochimiques ont confirmé cette biodiversité, suggérant leur potentiel de dégradation des hydrocarbures. En conclusion, cette étude met en évidence l'impact des hydrocarbures sur les sols contaminés et souligne la diversité bactérienne dégradatrice. Des perspectives futures incluent la caractérisation métabolique et moléculaire des souches bactériennes, l'évaluation de leur capacité de dégradation, l'isolement des champignons et des microalgues, et l'utilisation de l'approche métagénomique pour analyser les communautés microbiennes des sites contaminés.

Abstract

Various physical, chemical, and microbiological parameters of soils contaminated with hydrocarbons in a gas station in Fréha were studied. The results indicate an increase in pH and water content as one moves away from the pollution source. There was a significant bacterial diversity observed, with higher bacterial counts in the soil samples closer to the pollution source. Biochemical tests confirmed the presence of enzymes in the isolated bacterial strains, suggesting their potential for hydrocarbon degradation. In conclusion, this study highlights the impact of hydrocarbons on contaminated soils and underscores the diverse range of bacteria capable of degradation. Future perspectives include further metabolic and molecular characterization of the bacterial strains, assessing their hydrocarbon degradation abilities, isolating fungi and microalgae using cultivation methods, and utilizing metagenomic approaches to comprehensively analyze the microbial communities in these contaminated sites.